

발아 벼로부터 tricetin 4'-O-(threo-β-guaiacylglycerol) ether 생성균주의 분리 및 동정

윤나라 · 장귀영 · 이윤정 · Meishan Li · 김민영 · 김현영¹ · 이준수 · 정헌상*
충북대학교 식품생명공학과, ¹농촌진흥청 국립식량과학원 작물기초기반과

Isolation and identification of a tricetin 4'-O-(threo-β-guaiacylglycerol) ether producing microorganism from germinated rice

Nara Yoon, Gwi Yeong Jang, Yoon Jeong Lee, Meishan Li, Min Young Kim,
Hyun Young Kim¹, Junsoo Lee, and Heon Sang Jeong*

Department of Food Science and Biotechnology, Chungbuk National University

¹Division of Rice and Winter Cereal Crop, National Institute of Crop Science, Rural Development Administration

Abstract This study was conducted to isolate and identify a microorganism that increases tricetin-O-(threo-β-guaiacylglycerol) ether (TTGE) content in the hulls of rice (*Oryza sativa* L.). Bacteria from germinated rice were isolated by enrichment cultivation using yeast mold, luria bertani, potato dextrose and mannitol egg yolk polymyxin broths. The highest increase in TTGE content (339.30 μg/g) was achieved by a microorganism isolated by PDA enrichment cultivation. On the basis of 16S RNA sequence homology and phylogenetic analysis, the isolated bacterium was identified to have 100% similarity with *Burkholderia vietnamiensis*. The isolated bacteria were short rods, negative for the Gram stain, and positive for the catalase test. The highest TTGE level was 435.86 μg/g in 72-h fermented samples, representing a 2.5x increase compared with the control (175.65 μg/g). In conclusion, the bacterium isolated from germinated rice extract was *Burkholderia vietnamiensis*, and the optimum fermentation period to maximize TTGE levels was 72 h. These findings might help in developing functional materials using rice hulls, a waste product of rice milling.

Keywords: rice hull, tricetin 4'-O-(threo-β-guaiacylglycerol) ether, *Burkholderia vietnamiensis*, isolation, identification.

서 론

한국을 비롯한 아시아, 남미, 아프리카의 국가들은 쌀을 주식으로 하고 있으며, 벼를 쌀로 가공하는 과정에서 왕겨, 벼짚, 미강 등이 부산물로 생산된다(1,2). 우리나라에서는 연간 100만 톤 이상의 왕겨가 생산되고 벼의 약 18-20%를 차지하며, 썩지 않는 특성 때문에 부산물이 아닌 폐기물로 분류해서 관리되고 있어 매년 45만 톤 정도가 소각 또는 폐기되고 있는 실정이다(3-5). 왕겨에 함유된 천연 산화방지 성분으로는 플라보노이드(flavonoid), 사이아니딘(cyanidin), 피트산(phytic acid), 페룰산(ferulic acid), 바닐린(vanillin)과 시린그알데하이드(syringaldehyde) 등이 있다고 알려져 있다(6,7). 그 중 대표적인 생리활성물질로 플라보노이드(flavonoid)인 트리신(tricetin)과 플라보노리그닌(flavonolignan)인 tricetin 4'-O-(threo-β-guaiacylglycerol) ether (TTGE)는 벼과 식물인 *Oryza sativa* 로부터 분리 동정된 물질로 강력한 항암, 항염과 산화방지 활성 등이 보고되었다(8). TTGE는 예로부터 고대 인도 의학

(Ayurveda)에서 추천된 많은 약효 성분들 중 하나로 특별한 쌀 품종인 Njavara로부터 분리되었다(9). Njavara는 관절염, 신경계 질환, 마비, 결핵, 피부 질환 등의 치료제로써 사용되어 왔으며, 최근 연구에서도 항염 활성, 활성 산소 종과 산화질소(NO) 생성억제 등의 다양한 생리활성을 나타내는 연구들이 진행되고 있다(10,11).

국내의 TTGE에 관한 연구로는 왕겨로부터 TTGE를 효율적으로 추출할 수 있는 추출조건에 대한 연구(12)와 벼에서 분리한 TTGE의 항암활성(11)에 관한 연구가 진행되었을 뿐 관련 연구를 찾아보기 어려운 실정이다. *Burkholderia* 속은 그람 음성의 막대 모양의 세균으로, 카탈레이스(catalase)를 생성하며, 일부 종의 경우 병원성미생물로 알려져 있으며, 단백질가수분해효소(protease), lipase chitinase collagenase, 폴리갈락투로네이스(polygalacturonase), 그리고 포스포라이페이스(phospholipase) 등의 세포의 효소와 siderophore, 식물병원성 독소 그리고 일부 식물성장 호르몬 등을 생산하는 것으로 알려져 있다(13). 또한 농약이나 기름으로 오염된 토양의 생물학적 복원과 식물호르몬을 이용한 성장촉진 그리고 식물병해충의 생물학적 방제에 활용되고 있다(14).

왕겨에 함유된 TTGE의 함량은 미량이며 이런 유용성분들을 활용하기 위한 여러 가지 처리들에 대한 연구는 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 폐기되는 왕겨를 활용하여 왕겨의 유용성분인 TTGE를 기능 소재로 사용하기 위하여 TTGE를 다량 생성하는 미생물을 발아 벼 추출물로부터 분리 및 동정하고, TTGE를 가장 많이 생성시키는 조건을 설정하고자 하였다.

*Corresponding author: Heon Sang Jeong, Dept. of Food Science and Biotechnology, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 08644, Korea
Tel: +82-43-261-2570
Fax: +82-43-271-4412
E-mail: hsjeong@chungbuk.ac.kr
Received May 3, 2016; revised May 30, 2016;
accepted May 30, 2016

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용된 벼는 2014년에 충북 증평군에서 재배된 일 품벼(*Oryza sativa* var Ilpumbyeo)를 구매하여 사용하였다.

발아 벼 제조와 균 분리

발아는 Kim 등(15)의 방법에 따라 일품 벼를 20°C의 물로 수 세하고 3일간 침지시킨 다음 발아기(TP-CB 400, Ezione Inc., Beijing, China)로 발아시켰다. 발아 온도는 37°C, 습도는 85%로 유지하였으며, 발아기간은 3일로 하였다. 발아된 벼는 냉동 건조 후 80 메시(mesh)로 분쇄하여 시료로 사용하였다. 분쇄된 발아 벼에 0.05 M 인산완충용액을 4배량 가한 후 균질기(homogenizer)로 10분 간 균질화 시킨 후 진탕배양기(shaking incubator)로 10°C에서 1시간 동안 150 rpm으로 추출하였다. 추출물을 0.22 µm 필터로 감압 여과 후 남은 잔여물을 증류수로 희석 한 후 yeast mold (YM, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) luria bertani (LB, Becton Dickinson), potato dextrose (PDA, Becton Dickinson), mannitol egg york polymyxin (MYP, Becton Dickinson) 배지에 도말하여 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 형성된 콜로니(colony)는 크기, 모양과 색 등의 형태학적 특성에 따라 분류하고 무작위로 3개를 선택하였으며, 단일 콜로니로부터 3회의 계대배양을 통해 미생물을 순수분리 할 수 있었다. 분리한 균은 TSB 배지에서 배양한 후 50% 글리세롤(glycerol)로 조성하여 -70°C에서 보관하며 사용하였다.

균주의 동정

동정을 위해 솔젠트사(SolGent Co. Ltd., Daejeon, Korea)에 의뢰하였으며, 동정은 16s rRNA sequencing으로 이루어졌다. 증폭된 PCR 산물은 PCR product purification kit (QIAquickPCR Purification Kit, Hilden, Germany)을 사용하여 정제한 후, BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)와 automated DNA analyzer system (PRISM 3730XL DNA Analyzer, Applied Biosystems)을 통하여 염기서열을 분석하였다. 분석한 염기서열의 절편을 SeqMan software (version 4.1, DNASTAR, Madison, WI, USA)로 조합하여 16S rRNA의 염기서열을 얻었다. 각 미생물 별로 조합된 16S rRNA 염기서열을 GenBank database (NCBI database) 통해 기존에 보고된 미생물의 16S rRNA 염기서열과 상동성을 비교함으로써 발아 벼 내 균집을 이루는 원핵 세균의 분류군과 대표적인 종, 이를 바탕으로 한 균집의 분포도를 확인하였다. 그리고 분리된 미생물의 16S rRNA 염기서열을 CLUSTAL W program(16)으로 multiple sequence alignment한 후, MEGA 4.0 (17)을 사용하여 phylogenetic consensus tree를 작성하였다.

균주의 특성조사

동정 결과 *Burkholderia* 속으로 판명되어진 분리된 균주를 *Burkholderia* 속의 특징과 일치하는지 확인하기 위해 그람(Gram) 염색(18)과 카탈레이스 시험(catalase test) (19)을 실시하였다.

왕겨의 발효기간 설정

왕겨의 TTGE 함량의 증대를 위해 왕겨 1g에 증류수를 10배 수 가하여 120°C에서 15분 동안 살균하고, 50% glycerol에 보관 하던 균주를 2.97E CFU/mL 취하여 접종하여 6, 12, 24, 48, 72, 96 및 120시간 동안 37°C 배양기(incubator)에서 배양시켰다.

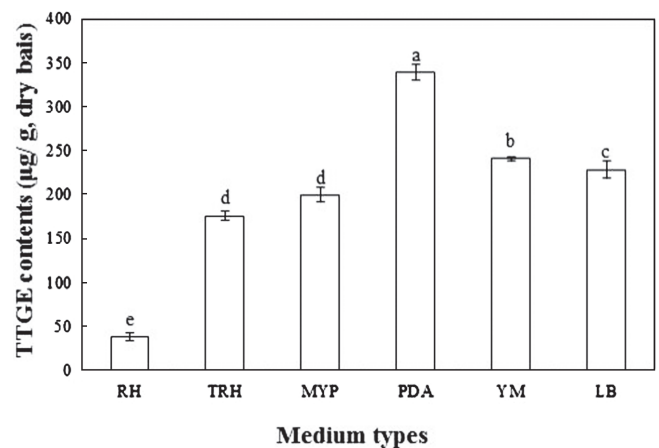


Fig. 1. Changes in tricrin 4'-O-(threo-β-guaiacylglyceryl) ether contents of rice hull in different cultures with isolated microorganisms inoculation from germinated rough rice. Different letters indicate a significant difference ($p < 0.05$) among different treatment. *RH: Rice hull, TRH: Thermal treatment on rice hull, MYP: Mannitol egg yolk polymyxin agar, PDA: Potato dextrose agar, YM: Yeast mold agar, LB: Luria bertani agar.

TTGE 함량 측정

각각 처리된 시료에 70% 에탄올(ethanol)을 20배량 첨가하고 1시간 동안 3회 초음파 추출하였다. 추출물은 여과 및 농축한 후 5 mL로 정용하여 헥세인(hexane)으로 탈지하고, 클로로폼(chloroform)으로 분획한 층을 사용하였다. Chloroform 층을 감압 농축하여 HPLC용 메탄올에 재용해한 다음 0.2 µm syringe filter (Millipore, Billerica, MA, USA)로 여과하여 HPLC (ACME 9000 system, Younglin, Anyang, Korea)로 분석하였다. 분석조건으로 이동상은 아세토나이트릴(A)과 물(B)을 기울기(gradient) 조건으로 흘려주었고, gradient 조건은 A:B를 초기 70:30 (% , V/V)에서 30분에 50:50, 40분에 0:100, 50분에 70:30로 설정하였으며, 유속은 0.6 mL/min으로 하였고, 주입량은 20 µL로 설정하였다. 검출기는 UV 206 nm에서 검출하였으며, 컬럼은 Mightysil RP-18 GP column (4.6×250 mm)을 사용하였다(14).

통계처리

통계분석은 SPSS 통계프로그램(Statistical Package for the Social Science, Ver. 12.0 SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 각 측정군의 평균과 표준편차를 산출하고 던컨 시험(Duncan's multiple range test)을 이용하여 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

배지의 미생물에 따른 왕겨의 TTGE 함량

균주의 분리를 위해 MYP, PDA, YM 및 LB 배지에 발아 벼로부터 추출한 조효소액을 여과한 잔여물을 도말하였으며 각 배지에서 분리한 균을 살균한 왕겨에 접종하여 반응시켜 TTGE 함량을 측정된 결과는 Fig. 1과 같다. 각각의 배지에서 분리한 균을 접종한 처리구를 비교해 보았을 때, TTGE 함량은 MYP 배지에서 분리한 균을 처리한 왕겨에서 199.38 µg/g, PDA 배지에서 분리한 균을 처리한 왕겨에서 339.30 µg/g, YM 배지에서 분리한 균을 처리한 왕겨에서 240.96 µg/g, LB 배지에서 분리한 균을 처리한 왕겨에서 228.33 µg/g으로 모두 무처리 왕겨(37.95 µg/g)에 비해 유의적으로 증가하였으나 살균한 왕겨(175.65 µg/g)와 비교

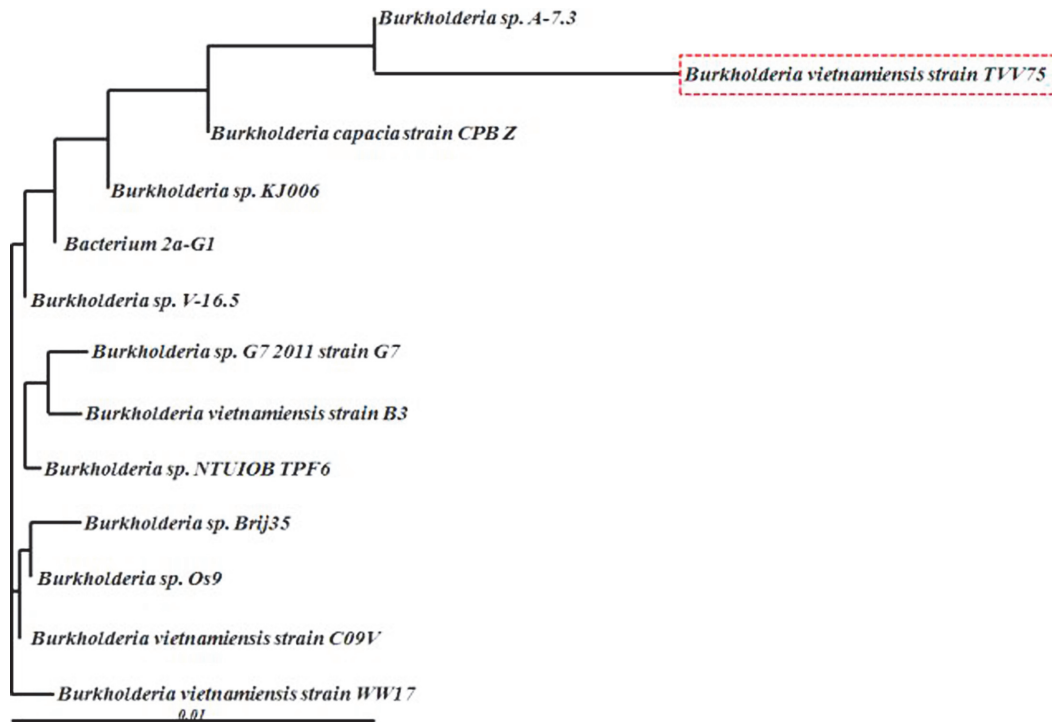


Fig. 2. The phylogenetic consensus tree of composition of bacteria from germinated rough rice in PDA culture.

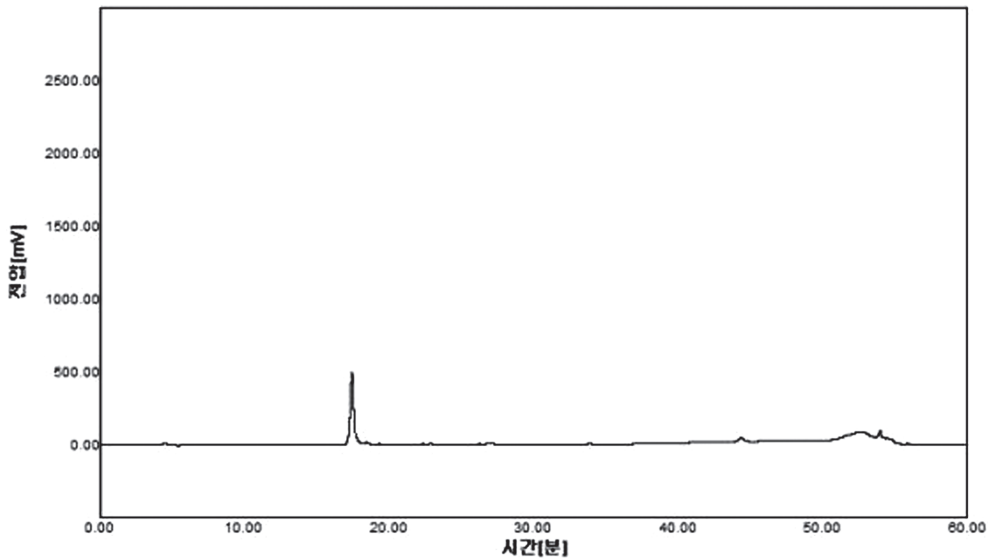


Fig. 3. The chromatograms of tricin 4'-O-(threo-β-guaiacylglyceryl) ether (TTGE) found in standard.

Table 1. Morphological and biochemical characteristics of *Burkholderia vietnamiensis* isolated from germinated rice

Morphological characteristics	Biochemical characteristics
Cell form: short rods	Catalase: (+)
Gram stain: (-)	

해 보았을 때 PDA 배지에서 분리한 균을 처리한 왕겨의 TTGE 함량이 가장 많이 증가하였다. 이는 왕겨로부터 TTGE의 최적 추출조건을 설정한 연구(12)에서 가장 많이 추출되었던 24시간 동안 교반 추출한 조건보다 약 8.3배 증가된 결과이므로 발아 벼의 미생물이 TTGE의 함량을 유의적으로 증대시키는 역할을 한

다는 것을 알 수 있다. 따라서 TTGE를 생성시키는 균주로 PDA 배지에서 분리한 균을 선정하여 동정을 실시하였다.

균주의 동정과 특성

PDA 배지에서 무작위로 선택한 3개의 콜로니로부터 분리한 균을 NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)의 blast program을 사용하여 GenBank에 등록된 16S rRNA 유전자들과 상동성을 비교하였다. 그 결과 모두 *Burkholderia vietnamiensis* strain TVV75 (Accession NO; NR 118872.1) 유전자와 100% (2335/2335) 상동성을 보였다. 따라서 본 균주는 최종 *B. vietnamiensis*로 동정되었으며, 이를 형태학적

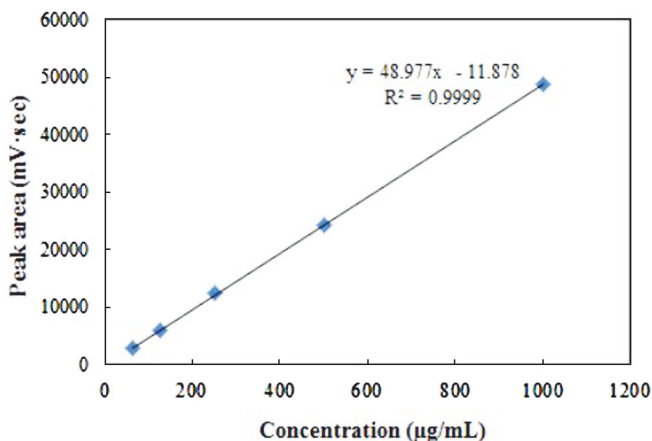


Fig. 4. The standard curve of triclin 4'-O-(threo-β-guaiacylglyceryl) ether (TTGE).

및 생화학적 유사성을 확인하기 위하여 현미경으로 관찰하고 Gram 염색과 catalase 반응을 실험한 결과는 Table 1 및 Fig. 2와 같다. 실험 결과 균주의 형태는 짧은 막대(short rod)이며 Gram 음성 세균이었고, 산소에 의해 발생하는 과산화수소의 유해성 제거를 위한 catalase 활성은 양성을 나타내어 기존에 알려진 *Burkholderia* 속과 특성과 일치하였다. 분리된 세균은 농약이나 기름으로 오염된 토양의 생물학적 복원과 식물호르몬을 이용한 성장촉진 그리고 식물병해충의 생물학적 방제에 이용되고 있는 세균으로 알려져 있다(14).

발효기간에 따른 왕겨의 TTGE 함량

발아 벼로부터 분리한 균주가 왕겨의 TTGE 함량에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 살균한 왕겨에 세균을 처리한 후 배양을 다르게 하여 분석하였다. TTGE의 표준물질에 대한 크로마토그램은 Fig. 3과 같고, Fig. 4에 표준곡선을 나타내었으며 샘플에 대한 분석 결과는 Fig. 5와 같다. 세균을 처리한 결과 TTGE의 함량은 배양 기간에 따라 점점 증가하는 경향을 보이다 일정 기간 후 약간 감소하는 경향을 나타내었다. 대조구(175.65 μg/g)에 비해 TTGE가 가장 많이 증가한 배양기간은 72시간(435.86 μg/g)으로 약 2.5배 증가하였다. 따라서 발아 벼로부터 분리한 균주는 왕겨에서 TTGE의 함량을 증대시키며 37°C에서 72시간 배양하였을 때 가장 많이 증대시키는 것으로 나타났으며, 이는 왕겨로부터 TTGE의 최적 추출조건을 설정한 연구(12)에서 가장 많이 추출되었던 24시간 동안 교반 추출한 조건보다 약 10.7배 증가된 수준이다. 또한 *Escherichia coli*의 플라보노이드 이종 생산에 관한 광범위한 연구들이 최근 보고 되고 있으며(20-25), 전구체인 아미노산을 공급하지 않으면서 포도당으로부터 플라보노이드의 전구물질인 나린게닌(naringenin)을 직접 생성하는 미생물의 메커니즘이 밝혀졌다(24). 그러므로 발아 벼로부터 분리한 균주 역시 비슷한 메커니즘으로 플라보노리그닌 계열인 TTGE를 생성하는 것으로 생각되어지며 더 자세한 메커니즘을 알기 위해서는 이 미생물의 작용에 대한 연구가 더 진행되어야 할 것으로 판단된다.

이상의 결과를 종합해 보면 TTGE를 증대시킨다고 판단되어진 발아 벼 추출물로부터 분리 및 동정한 세균은 *B. vietnamiensis*로 밝혀졌으며, 특성 평가 결과 기존에 알려진 *B. vietnamiensis*과 같은 특성을 나타내었다. 또한 균을 왕겨에 접종하여 배양 시 배양 기간에 따라 TTGE의 함량이 증가하는 경향을 나타내었으며, 72 시간 배양 시 가장 많이 증가하였다.

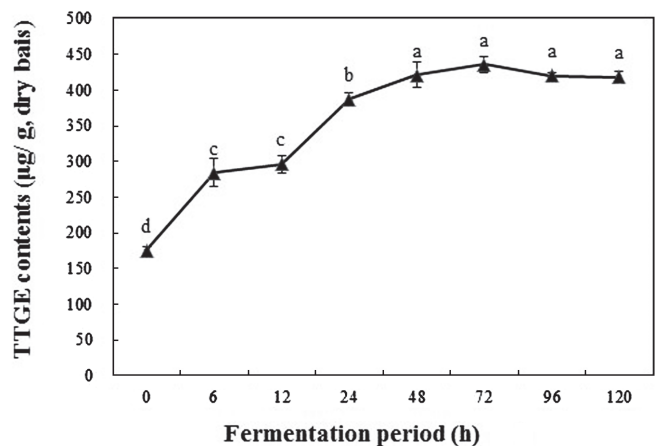


Fig. 5. Changes in triclin 4'-O-(threo-β-guaiacylglyceryl) ether contents in rice hull by fermentation period of *Burkholderia vietnamiensis* at 37°C. Different letters indicate a significant difference ($p < 0.05$) among different treatment.

요 약

본 연구는 왕겨에서 triclin 4'-O-(threo-β-guaiacylglyceryl) ether (TTGE)를 생성시키는 균주를 분리와 동정하기 위하여 실시하였다. 발아 벼 추출물을 MYP, PDA, YM 및 LB 배지에 배양하고 각 배지에서 분리한 균을 왕겨에 접종해 TTGE 생성량을 측정하고 결과 PDA 배지에서 자란 균에 의한 TTGE의 생성량(339.30 μg/g)이 가장 많았다. 분리한 균을 동정한 결과 *Burkholderia vietnamiensis*로 확인하였으며, 형태학적 및 생물학적 특성을 살펴본 결과 catalase 활성을 갖는 short rod 형태의 Gram 음성 세균인 것으로 확인해 기존 *Burkholderia* 속의 특성과 일치하였다. 또한 분리한 세균을 살균한 왕겨에 접종하여 배양시킨 결과 배양기간에 따라 TTGE의 함량은 증가하였으며, 72시간 동안 배양에서 435.86 μg/g로 가장 많은 증가를 나타내었다. 이러한 결과는 폐기되는 왕겨를 활용함으로써 왕겨의 함유된 TTGE의 함량을 증대시켜 기능 소재로 사용할 수 있는 기초 자료가 될 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 2015년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

References

- Lee YJ, Jung WK, Sung YJ. Evaluation of fiberization of rice hull by autohydrolysis conditions. *CNU J. Agric. Sci.* 38: 95-100 (2011)
- Park JH, Jin JH, Kim HJ, Park HR, Lee SC. Effect of far-infrared irradiation on the antioxidant activity of extracts from rice hulls. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 34: 131-134 (2005)
- Park SJ, Kim MH, Shin HM. Chemical compositions and thermal characteristics of rice husk and rice husk ash in Korea. *J. Biosystems Eng.* 30: 235-241 (2005)
- Oh SW, Kang CH. Studies on the physical properties of molded packaging material using rice-straw pulp. *J. Korean Wood Sci. Technol.* 27: 79-87 (1999)
- No SY. Effective utilization methods of rice husk. *J. Biosystems Eng.* 23: 507-518 (1998)
- Ramarathnam N, Osawa T, Namiki M, Kawakishi S. Chemical studies on novel rice hull antioxidants. 2. Identification of isovi-

- texin, a C-glycosyl flavonoid. *J. Agr. Food Chem.* 37: 316-318 (1989)
7. Rho YD, Beak NI, Lee MH. Separation and identification of natural herbicidal substance from rice hull. *Weed Turf. Sci.* 21: 49-57 (2001)
 8. Jeong RH, Lee DY, Cho JG, Lee SM, Kang HC, Seo WD, Kang HW, Kim JY, Baek NI. A new flavonolignan from the aerial parts of *Oryza sativa* L. inhibits nitric oxide production in raw 264.7 macrophage cells. *J. Korean Soc. Appl. Bi.* 54: 865-870 (2011)
 9. Jiao J, Zhang Y, Liu C, Liu J, Wu X, Zhang Y. Separation and purification of tricetin from an antioxidant product derived from bamboo leaves. *J. Agr. Food Chem.* 55: 10086-10092 (2007)
 10. Mohanlal S, Parvathy R, Shalini V, Helen A, Jayalekshmy A. Isolation, characterization and quantification of tricetin and flavonolignans in the medicinal rice Njavara (*Oryza sativa* L.), as compared to staple varieties. *Plant Food. Hum. Nutr.* 66: 91-96 (2007)
 11. Jung YS, Kim DH, Hwang JY, Yun NY, Lee YH, Han SB, Hwang BY, Lee MS, Jeong HS, Hong JH. Anti-inflammatory effect of tricetin 4'-O-(threo- β -guaiacylglyceryl) ether, a novel flavonolignan compound isolated from Njavara on in raw 264.7 cells and in ear mice edema. *Toxicol. Appl. Pharm.* 277: 67-76 (2014)
 12. Yoon NR, Lee SH, Jang GW, Lee YJ, Li M, Kim MY, Lee JS, Jeong HS. Optimum extraction of tricetin and tricetin 4'-O-(threo- β -guaiacylglyceryl) ether (TTGE) from rice hull (*Oryza sativa* L.). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 44: 1923-1926 (2015)
 13. Vial L, Groleau MC, Dekimpe V, Dziel . Burkholderia diversity and versatility: An inventory of the extracellular products. *J. Microbiol. Biotech.* 17: 1407-1429 (2007)
 14. Wopperer J, Cardona ST, Huber B, Jacobi CA, Valvano MA, Eberl L. A quorum-quenching approach to investigate the conservation of quorum-sensing-regulated functions within the *Burkholderia cepacia* complex. *Appl. Environ. Microb.* 72: 1579-1587 (2006)
 15. Kim MY, Lee SH, Jang GY, Park HJ, Li M, Kim SJ, Lee YR, Noh YH, Lee JS, Jeong HS. Effects of high hydrostatic pressure treatment on the enhancement of functional components of germinated rough rice (*Oryza sativa* L.). *Food Chem.* 166: 86-92 (2015)
 16. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The clustal_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25: 4876-4882 (1997)
 17. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599 (2007)
 18. Wheater DM. The characteristics of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *Microbiology* 12: 123-132 (1955)
 19. Whittenbury R. Hydrogen peroxide formation and catalase activity in the lactic acid bacteria. *Microbiology* 35: 13-26 (1964)
 20. Fowler ZL, Gikandi WW, Koffas MAG. Increased malonyl coenzyme a biosynthesis by tuning the *Escherichia coli* metabolic network and its application to flavanone production. *Appl. Environ. Microb.* 75: 5831-5839 (2009)
 21. Leonard E, Chemler J, Lim KH, Koffas MAG. Expression of a soluble flavone synthase allows the biosynthesis of phytoestrogen derivatives in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol Biot.* 70: 85-91 (2006)
 22. Leonard E, Yan Y, Koffas MAG. Functional expression of a P450 flavonoid hydroxylase for the biosynthesis of plant-specific hydroxylated flavonols in *Escherichia coli*. *Metab. Eng.* 8: 172-181 (2006)
 23. Leonard E, Lim KH, Saw PN, Koffas MAG. Engineering central metabolic pathways for high-level flavonoid production in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microb.* 73: 3877-3886 (2007)
 24. Santos CNS, Koffas M, Stephanopoulos G. Optimization of a heterologous pathway for the production of flavonoids from glucose. *Metab. Eng.* 13: 392-400 (2011)
 25. Trantas E, Panopoulos N, Ververidis F. Metabolic engineering of the complete pathway leading to heterologous biosynthesis of various flavonoids and stilbenoids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab. Eng.* 11: 355-366 (2009)