



## Biosynthesis of bioactive isokaemferide from naringenin in *Escherichia coli*

Bong-Gyu Kim<sup>1</sup>

### 대장균에서 naringenin으로부터 생리활성 isokaemferide의 생합성

김 봉 규<sup>1</sup>

Received: 20 November 2018 / Accepted: 28 November 2018 / Published Online: 31 March 2019  
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2019

**Abstract** The flavonoid, isokaempferide, has various biological activities such as hepatoprotective, antimicrobial and antiproliferative effect and is extracted from *Amburana cearensis* and *Cirsium rivulare* (Jacq.). Biotransformation is an alternative tool for the synthesis of value-added flavonoids with inexpensive substrates. Here, to synthesize isokaempferide from naringenin, two genes, *PFLS* and Rice *O*-methyltransferase-9 were introduced in *Escherichia coli*. Although isokaempferide was successfully synthesized, the amount of biosynthesis was no high. In order to increase the yields of isokaempferide, *S*-adenosylmethionine (SAM) used as a methyl donor was increased by deleting *MetJ*, which is a transcriptional regulator related to SAM biosynthetic pathway. Next we optimized the cell concentration and substrate feed concentration with the engineered *E. coli* strain. Through these strategies, the biosynthesis of isokaempferide was increased up to 87 mg/L.

**Keywords** Biotransformation · Flavonoids · Flavonol synthase · Metabolic engineering · *O*-methyltransferase

### 서론

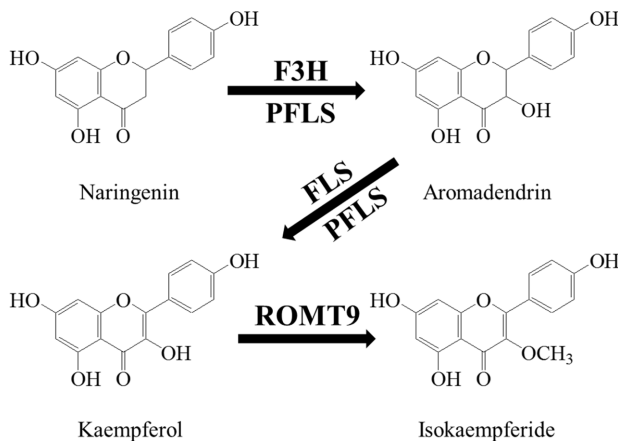
식물이 생합성 하는 알칼로이드, 테르페노이드, 폴리페놀 등과 같은 이차대사산물은 기능성식품, 화장품, 의약품 등을 개발하기 위한 중요한 소재이다[1-3]. 특히 폴리페놀에 속하는 플라보노이드는 가장 잘 알려진 이차대사산물중의 하나로서 항산화, 항암, 항노화, 항균, 항염 등과 사람의 건강과 관련된 다양한 생리적 기능뿐만 아니라 박테리아, 곰팡이, 바이러스, 곤충 등에 의해 야기되는 식물성 병에 대한 방어물질로 작용하는 것으로 알려져 있다[4,5]. 플라보노이드의 다양한 의학적 유용성에도 불구하고 대부분의 플라보노이드는 식물로부터 추출하여 사용되기 때문에 유용한 플라보노이드를 안정적이고 일정하게 공급하는 것이 어렵다[6,7]. 화학합성법으로 플라보노이드를 생합성할 수 있지만, 플라보노이드 합성반응에 독성물질이 필요하거나 때로는 아주 극단적인 반응조건을 필요로 하는 경우가 있다[8]. 따라서 이러한 어려움을 극복하고 다양한 식·의약 소재로 사용하기 위해 플라보노이드를 안정적으로 공급하기 위한 방법으로 식물세포배양법, hairy root배양법, 효모배양법, 미생물 배양법 등을 이용한 생산법 개발들이 시도되고 있다[9-11]. 이들 중 미생물을 이용한 플라보노이드 생산시스템은 다른 생산 공정법에 비해 배양이 쉽고, 형질전환이 가능하며, 생합성에 필요한 각종 조효소들의 생합성경로 대사조절이 가능하기 때문에 최근 들어 플라보노이드 생산 공정시스템을 개발하려는 연구가 다양하게 시도되고 있다[11,12].

플라보노이드는 식물에서 페닐프로파노이드 생합성경로를 통해서 만들어지는 플라보노이드는 현재 약 9,000종 이상이 다양한 식물들에서 발견되고 있다[10]. 식물에서 플라보노이드 생합성은 phenylalanine ammonia lyase (PAL)에 의해 페닐알라닌을 cinnamic acid로 전환하는 것으로부터 시작한다. Cinnamic acid는 cinnamic acid 4-hydroxylase에 의해 *p*-coumaric acid로 전환되고 순차적으로 4-Coumarate-CoA ligase, Chalcone synthase, chalcone isomerase에 의해 naringenin이 생합성되고 이는 다양

Bong-Gyu Kim (✉)  
E-mail: dkimbk@gntech.ac.kr

<sup>1</sup>Department of Forest Resources, Gyeongnam National University of Science and Technology, 33 Dongjin-ro, Jinju-si, Gyeongsangman-do, Jinju 52725, Republic of Korea

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.



**Fig. 1** Biosynthesis pathway of isokaempferide from naringenin. F3H, flavanone 3-hydroxylase; FLS, flavonol synthase; PFLS, poplar flavonol synthase; ROMT9, rice *O*-methyltransferase

한 플라보노이드를 생합성의 전구물질로 사용된다[13]. 플라보노이드는 일반적으로 B링과 C링의 연결위치, hydroxylation, oxidation, saturation의 정도에 따라 플라바논, 플라보놀, 플라본, 이소플라본, 플라반-3-ol, 안토시아닌 등의 6그룹으로 나누어진다[14]. 이들 중 플라보놀은 폐암, 결장암, 유방암, 위암, 식도암, 류마티스관절염, 당뇨병, 천식, 백내장 등의 다양한 질병에 효과를 보이는 것으로 보고되고 있다[15]. 플라보놀은 안토시아닌, 프로안토시아닌과 생합성 경로를 공유한다. 일반적으로 식물에서 flavonol의 합성은 naringenin을 시발물질로 flavanone 3-hydroxylase (F3H)에 의해 dihydroflavonol로 촉매 되고 이는 다시 flavonol synthase (FLS)에 의해 flavonol (kaempferol)이 생합성 된다(Fig. 1). 하지만, 최근의 연구에 의하면 이러한 naringenin으로부터 kaempferol을 생합성 할 수 있는 새로운 type의 FLS유전자가 보고되었다[16].

Isokaempferide는 주로 *Amburana cearensis*와 *Cirsium rivulare* (Jacq.) 로부터 추출되는 3-*O*-methylated kaempferol이다. Isokaempferide (5,7,4'-trihydroxy-3-methoxyflavone)의 *in vitro* 연구에서 간 보호, 항균, 항증식성, 항염 등의 효과를 가지는 것을 보였으며 기니 피그 적출기관(guinea pig isolated trachea)을 대상으로 한 실험에서 isokaempferide는 근육이완효과를 보였다 [17-20]. 이와 같이 다양한 생리활성에도 불구하고 isokaempferide는 식물에서 추출되어 사용되기 때문에 이물질에 안정적으로 공급하기 위해서는 공간적 계절적으로 많은 제약을 받는다[20]. 따라서 isokaempferide의 공급뿐만 아니라 다른 생리활성들을 탐색하기 위해서 이 물질을 안정적으로 공급할 수 있는 대체 생산법의 개발이 필요하다.

본 연구에서 Poplar flavonol synthase (PeFLS)와 Rice *O*-methyltransferase-9 (ROMT-9)를 이용하여 naringenin으로부터 isokaempferide를 생합성을 시도하였다. 또한 메틸전이효소의 donor로 사용되는 *S*-adenosyl methionine (SAM)의 생합성 증가를 시도하였고, isokaempferide생합성 최적화를 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 발현벡터 및 돌연변이체 제작

PeFLS의 발현벡터제작은 이전에 클로닝한 플라스미드를 주형으로 이용하였다[21]. PCR은 Taq polymerase를 활성화 시키기 위하여 94 °C에서 15분간 배양한 후 94 °C에서 1분, 60 °C에서 1분, 72 °C에서 1분, 총 35회 반복조건하에서 Hotstart Taq polymerase (Qiagen, Hilden, Germany)을 이용하여 실시하였다. Forward primer로 ATGAATTCGATGGAGTTTGATAGAGTTCAA (밀줄 *EcoR* I)와 reverse primer로 CATGCGGCCGCTA CTGGGGGAGACGATTG (밀줄 *Not* I)을 실험에 사용하였다. PCR산물은 아가로스겔상에서 전기영동 한 후 Gel DNA Purification Kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 정제하여 *EcoR* I/*Not* I 제한효소를 처리한 후 pCDFDuet의 동일한 제한효소자리에 클로닝 하였다. ROMT-9은 이전의 연구에서 구축된 플라스미드를 본 연구에 사용하였다[22].

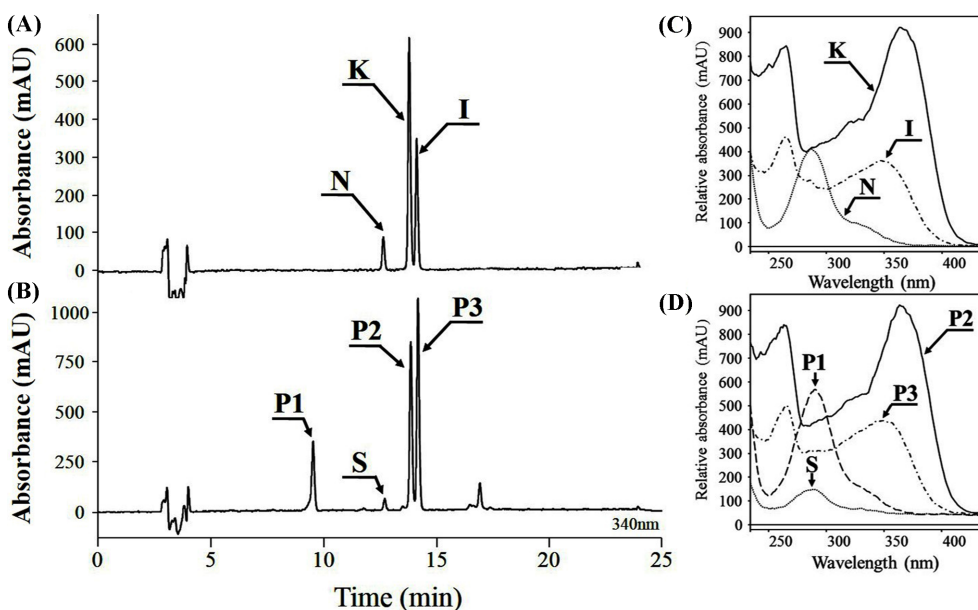
대장균 BL21 (De3)에서의 MetJ의 결실은 quick and easy conditional knockout kit (Gene Bridges, Heidelberg, Germany)를 사용하였다. MetJ 결실은 FRT-PGK-gb2-neo-FRT DNA를 template로 forward primer로 5'-CGTAGCGCATCAGGCGATTCCACTCCGCGCCGCTCTTTTTTGGCTTTAGTAAATTAACCCTCACTAAAGGGCG-3'와 reverse primer로 5'-TTCTTTGCGTATAGATTGAGCAAATCCCAAATAGCCGTTAAAATTATATGTATACGACTCACTATAGGGCTC-3'를 사용하였다. 돌연변이체의 확인은 forward primer 5'-GGTCGACACAACGTGCTCG-3'와 reverse primer 5'-ACGCACTGCGATGGTGGCT-3'를 가지고 PCR로 확인하였다.

### 생물전환

PeFLS와 ROMT-9를 담고 있는 단일 콜로니를 ampicillin (50 µg/mL)과 spectinomycin (50 µg/mL)이 공급된 LB배지에 접종하여 37 °C에서 밤새도록 배양하였다. 다음날 아침 동일한 항생제가 첨가된 25 mL LB배지를 담고 있는 250 mL 플라스크에 배양액 250 µL를 접종하여 37 °C에서 배양하였다. 세포밀도가 OD600 nm에서 1.0에 도달하였을 때 IPTG의 최종농도가 1 mM이 되게 첨가하고 배양플라스크를 30 °C로 이동하여 20시간 동안 재조합단백질을 유도하였다. 배양이 끝난 후 원심분리기를 이용하여 세포를 회수한 후 10 mL Andrew's Magic Media (AMM)배지[23]로 2회 세척하고 동일 배지에 세포밀도가 OD600 nm에서 3.0이 되게 현탁 하였다. 배양배지에 IPTG 1 mM, ampicillin 50 µg, spectinomycin 50 µg, naringenin 300 µM의 최종농도가 되게 첨가하여 30 °C에서 생물전환을 실시하였다. 배양 12, 24시간 후 500 µL의 샘플을 회수하고 거기에 동량의 에칠아세테이트를 첨가하여 2회 반복하여 반응산물을 추출하였다. 반응산물은 진공건조기를 위하여 완전히 건조하여 DMSO 80 µL에 다시 녹여 HPLC분석에 이용하였다.

### HPLC분석

반응물은 photodiode array 검출기와 Polaris 5 C18-A column



**Fig. 2** HPLC and UV spectra of reaction product from B-PR. (A) HPLC chromatogram of standard naringenin, kaempferide, and isokaempferide; (B) HPLC chromatogram of reaction product. P1 was estimated to be aromadendrin by comparing with UV spectra. P2 and P3 were identified to be kaempferol and isokaempferide by comparing with authentic kaempferol and isokaempferide. (C) UV spectra of authentic naringenin, kaempferol, and isokaempferide. (D) UV spectra of reaction products, P1, P2, and P3

(250 mm×4.6 mm, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)가 부착된 Varian high performance liquid chromatography (HPLC) 시스템(Agilent Technologies)을 이용하여 분석하였다. HPLC분석은 0.1% formic acid가 첨가된 증류수(A buffer)와, 0.1% formic acid가 첨가된 acetonitrile (B buffer)를 사용하여 실시하였다. 분석프로그램은 0분에 20% B버퍼, 8분에 40% B버퍼, 12분에 90% B버퍼, 15분에 90% B버퍼, 15.1분에 10 B버퍼, 20분에 10% B버퍼의 조건을 사용하였다.

**결과 및 고찰**

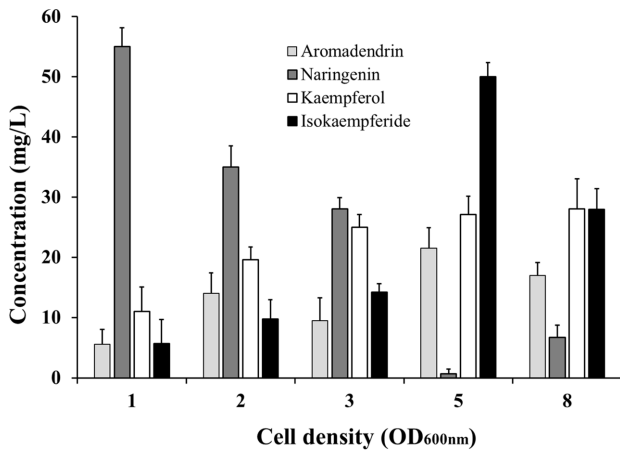
**Naringenin으로부터 isokaempferide 생합성**

Isokaempferide는 *Amburana cearensis*와 *Cirsium rivulare* (Jacq.)의 주요 구성물질로 간 보호, 항균, 항증식성, 항염 등의 생리 효과를 보이는 3-O-methylation된 kaempferol이다[17,18,20]. Naringenin으로부터 isokaempferide를 생합성 하기 위해서는 F3H, FLS, OMT (flavonoid O-methyl transferase) 등의 3유전자가 필요하다. 최근 연구결과에 의하면, 포플러에서 분리된 PFLS는 F3H와 FLS의 기능을 동시에 수행하는 것으로 보고되었다[16]. 벼에서 분리한 ROMT-9은 flavone 및 flavonol 3'-O-methyltransferase이지만, flavonol의 경우 3'의 hydroxyl group을 이용할 수 없을 때 3번 위치의 hydroxyl group을 methylation시킨다[16]. 따라서 대장균에서 naringenin을 기질로 isokaempferide를 생합성 하기 위해서 2개의 유전자, PFLS와 ROM-9을 이용하였다. 두 유전자, PFLS와 ROMT-9을 대장균 BL21 (DE3)에 형질전환 하였고 결과 균주를 BL-PR로 명명하였다. BL-PR균주를 이용하여 naringenin으로부터 isokaempferide의 생합성능력

을 테스트하기 위하여 2 mL LB배지를 이용하여 30 °C에서 20 시간 동안 재조합 단백질을 유도한 후 AMM배지를 이용하여 생물전환을 실시하였다. 생물전환 12시간 후 배양액을 회수하여 에칠아세테이트로 추출하고 완전히 건조한 후 HPLC분석을 실시하였다. 그 결과 기질로 사용된 naringenin (12.7 min)을 제외하고 총 3개의 새로운 peak이 생성되었다(Fig. 2B). P1 (9.5 min)의 UV흡광도는 기질로 사용된 나린제닌과 유사하였고 이는 전형적인 flavanone의 UV흡광도 패턴과 일치하였다. 따라서 이 물질은 kaempferol의 전구물질인 aromadendrin으로 추정되었다(Fig. 2D). P2 (13.8 min)는 전형적인 flavonol의 UV 흡광도를 가지고 있으며, 표준물질 kaempferol과 동일한 흡광도와 용출 시간대를 보였다(Fig. 2B). P3 (14.1 min)는 kaempferol의 흡광도에 비해서 band I의 UV최고 흡광도가 365 nm에서 350 nm으로 이동한 결과를 보였다(Fig. 2D). 이것은 flavonol의 3번 위치의 구조 변화에 의한 전형적인 hypsochromic shift 현상이다[24]. 따라서 P3는 isokaempferide로 추정되었다. P3의 구조를 명확하게 결정하기 위하여 반응물을 HPLC로 분리하여 <sup>1</sup>H-NMR 분석에 이용하였다. NMR 데이터의 분석 결과는 Acetone-d<sub>6</sub>, 500 MHz; 3.87 (3H, s), 6.26 (1H, d, J=2.1 Hz), 6.50 (1H, d, J=2.1 Hz), 7.02 (2H, d, J=9.0 Hz), 8.03 (2H, d, J=9.0 Hz), 12.80 (1H, s)와 같았다. 이러한 결과는 이전에 발표한 <sup>1</sup>H-NMR 결과와 일치하였다[25]. 이상의 결과를 종합해 보면 BL-PR 균주는 naringenin을 기질로 하여 isokaempferide 생합성이 가능하다는 알 수 있다.

**Isokaempferide 생합성을 증가를 위한 대장균 engineering**

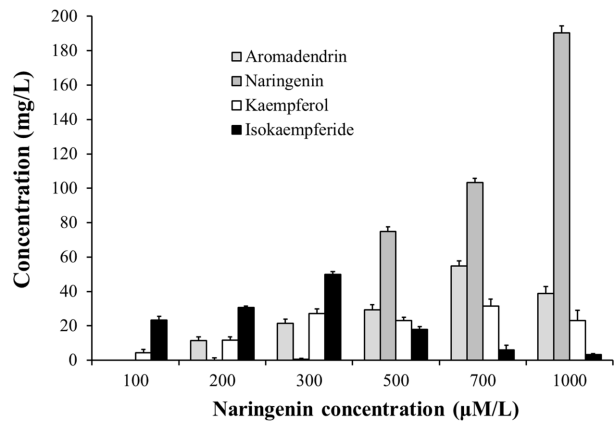
Isokaempferide는 naringenin으로부터 생합성이 가능하였지만, 생산량은 높지 않았다. 생물전환 시간을 증가하면 제공한 기질이



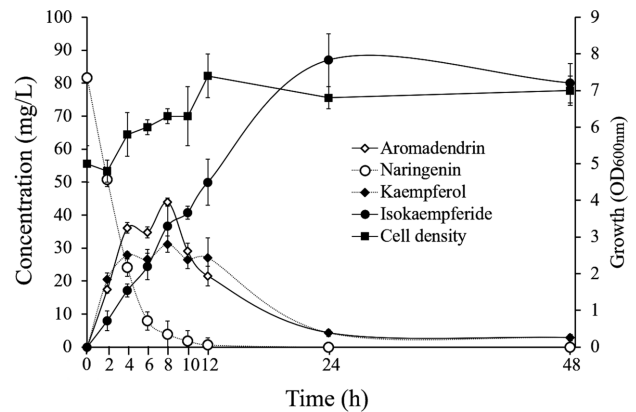
**Fig. 3** Optimization of cell concentration for production of isokaempferide from naringenin. A total of 300  $\mu\text{M}$  of naringenin was added. The reaction mixture was collected after 12 h of incubation at 30  $^{\circ}\text{C}$  and analyzed by HPLC. Error bar indicates mean values  $\pm$ SD from the independent experiments

전부 kaempferol로 생물전환이 되어도 isokaempferide로의 생물 전환은 전부 일어나지 않았다. 이러한 결과는 이전의 연구에서도 보고되었다[16]. 이는 대장균 생체내에서 공급되는 메칠 도너인 SAM의 공급이 isokaempferide의 생합성에 영향을 미칠 수 있다는 것을 암시한다. 이전에 연구에 의하면 대장균내 SAM synthase의 과발현은 SAM의 생합성을 크게 증가시키지 못하는 것으로 나타났다[26]. 이는 대장균에서 SAM의 생합성이 증가하면 리간드 반응 전사조절자인 MetJ에 의해서 SAM생합성과 관련된 9개의 프로모터로부터 적어도 12개의 유전자를 억제하는 것으로 알려져 있다[27]. Isokaempferide의 생합성에 MetJ의 영향을 알아보기 위하여 quick and easy conditional knockout kit (Gene Bridges, Heidelberg, Germany)를 이용하여 MetJ를 제거하였으며, 이 균주는 B-MetJ로 명명하였다. B-MetJ에 *PFLS*와 *ROMT-9*를 도입하였으며, 이 균주를 B-MetJ-PR로 명명하였다. B-MetJ-PR과 BL-PR균주의 isokaempferide의 생합성능력을 알아보았다. BL-PR균주는 9.8 mg/L를 생산한 반면 B-MetJ-PR균주는 17.9 mg/L를 생산하여 약 1.83배 정도 증가된 생합성능력을 보였다. 이러한 결과는 대장균내의 MetJ 결실이 isokaempferide의 생합성에 많은 영향을 미쳤다는 것을 알 수 있다.

B-MetJ-PR균주를 이용하여 최적의 생물전환조건을 탐색하기 위하여 생물전환시의 세포의 밀도 및 기질의 농도를 최적화 하였다. 먼저 세포 밀도의 최적화를 알아보기 위하여 OD<sub>600nm</sub>에서 세포밀도를 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 8.0으로 조절하였다. Isokaempferide의 생산은 30  $^{\circ}\text{C}$ 에서 12시간 배양 후 HPLC를 이용하여 분석하였다. 테스트한 세포밀도들 중에서 OD<sub>600</sub>=5.0 (약 49.8 mg/L)에서 가장 높은 생산을 보였으며 다음으로 8.0으로 약 27.9 mg/L를 이었다. 그에 반하여 세포의 밀도가 낮아지면 생물전환효율이 현저하게 감소하는 경향을 보여다(Fig. 3). 다음으로 기질 공급농도의 최적화를 알아보기 위하여 기질로 사용된 naringenin의 최종 공급농도를 100  $\mu\text{M}$  (27.2 mg/L), 200  $\mu\text{M}$  (54.4 mg/L), 300  $\mu\text{M}$  (81.6 mg/L), 500  $\mu\text{M}$  (136 mg/L), 700  $\mu\text{M}$  (81.6 mg/L), 1,000  $\mu\text{M}$  (272 mg/L)로 생물전환 배지에



**Fig. 4** Optimization of substrate feed concentration for production of isokaempferide from naringenin. Each concentration of naringenin was added. The reaction mixture was collected after 12 h of incubation at 30  $^{\circ}\text{C}$  and analyzed by HPLC. Error bar indicates mean values  $\pm$ SD from the independent experiments



**Fig. 5** Production of isokaempferide by *Escherichia coli* strain B-MetJ-PR. A total of 300  $\mu\text{M}$  of naringenin was added. The reaction mixture was collected periodically and the production of isokaempferide was monitored. Error bar indicates mean values  $\pm$ SD from the independent experiments

첨가하여 30  $^{\circ}\text{C}$ 에서 12시간 배양 후 isokaempferide의 생산성을 분석하였다. 테스트한 농도 중에서 300  $\mu\text{M}$ 에서 isokaempferide의 최적의 생산성을 보인데 반하여 그 이상의 기질 공급농도에서는 생합성능력은 현저히 저하되는 경향을 보였다(Fig. 4). 최적화된 조건을 이용하여 naringenin으로부터 isokaempferide의 생산을 30  $^{\circ}\text{C}$  교반배양기에서 48시간 동안 모니터링 하였다. Isokaempferide배양 후 2시간부터 생합성이 관찰되는데 반하여 naringenin의 농도는 급격하게 감소하기 시작하여 배양 후 12시간에 아주 소량만 이 관찰되었다. 중간물질인 aromadendrin과 kaempferol은 배양초기에 증가하였다가 배양 후 24시간에 대부분이 isokaempferide로 전환되는 것을 보였다. 이 시점에 약 87 mg/L의 isokaempferide 생산성을 보였으며, 배양 후 48시간에 isokaempferide 생산성은 약간 감소하는 경향을 보였다(Fig. 5).

미생물을 이용한 생리활성물질의 생산은 많은 연구자들의 관심을 받고 있다. 현재 간단한 탄소원인 포도당으로부터 플라보

노이드를 생합성 위한 많은 연구들이 진행되고 있다[13,27]. 하지만, 단순당으로부터 생리활성물질들을 생합성 하기 위해서는 복잡한 생합성 경로를 도입해야 하고, 이차대사산물 합성에 공급되는 cofactor와 같은 물질들을 미생물로부터 공급을 받아야 한다. 다른 말로 미생물 자체의 생합성과 생리활성물질생산 경로에 동시에 사용되기 때문에 각 단계의 cofactor를 원활하게 공급할 수 없는 문제점을 가지고 있어 생합성양의 증가에 많은 영향을 미친다[28]. 이러한 단점을 극복하기 위하여 대사공학법 등이 도입되어 다양한 물질을 전합성 하는 연구가 진행되고 있다[26,13,27]. 하지만, 단순당으로부터 전합성의 경우 복잡한 생합성경로 때문에 생리활성물질의 생산성을 증대시키는 데는 한계점을 보이고 있다. 이러한 단점을 극복할 수 있는 방법으로 값이 싼 물질을 기질로 사용하여 한 두 가지 효소를 미생물에 도입하여 생리활성물질을 생산 생물전환이다. 간 보호, 항균, 항증식성, 항염 등의 생리활성을 보이는 isokaempferide를 비교적 값이 싼 물질인 naringenin을 이용하여 생물전환을 실시하였다. 이에 부가적으로 메틸 donor인 SAM의 생합성 증대를 위한 대사조절과 배양방법을 최적화를 시도하였다. 그 결과 배양 후 24 시간에 약 87 mg/L의 isokaempferide를 생산할 수 있었으며 이것은 이전의 isokaempferide 생산 연구(22.6 mg/L)에 비해 약 3.85배 증가된 생산성을 보였다. 향 후 연구에서 생산성을 반응에 들어가는 다른  $\alpha$ -ketoglutaric acid와 같은 cofactor와 생물반응기를 이용한 생산성 증가에 대한 연구가 수행되어야 할 것이지만, 이상의 결과로 보아 본 연구에서 최적화한 isokaempferide 생산 방법은 기존의 식물에서의 추출방법을 보완해 줄 수 있을 것으로 보인다.

## 초 록

Flavonoid인 isokaempferide는 간 보호, 항균, 항증식성, 항염 등 다양한 생리활성을 가지는 것을 보고 되고 있으며 *Amburana cearensis*와 *Cirsium rivulare* (Jacq.)과 같은 식물에서 추출하여 사용한다. 생물전환은 비교적 값이 싼 물질로부터 고부가가치 물질을 얻기 위한 방법으로 유용물질의 식물추출법을 대체할 수 있는 방법이다. Naringenin으로부터 isokaempferide를 생합성 하기 위해 대장균에 포플러에서 분리한 *PFLS*와 벼에서 분리한 *ROMT-9* 유전자를 도입하였다. 이 균주를 이용하여 naringenin으로부터 isokaempferide의 생합성 수율(9.8 mg/L)은 낮았다. Isokaempferide의 생합성 수율을 높이기 위해 *S*-adenosyl-methionine (SAM) 생합성 경로의 transcriptional regulator인 MetJ를 제거함으로써 methyl donor로 사용되는 SAM을 증가시켰다. SAM생합성 대사를 조절한 대장균을 이용하여 생물전환 균주의 최적 세포밀도 및 최적의 기질공급 농도를 결정하였다. 최적화된 조건을 이용하여 isokaempferide의 생합성은 87 mg/L 까지 증가하였다.

**Keywords** 대사공학 · *O*-메틸전이효소 · 생물전환 · 플라보노이드 · 플라보놀 합성유전자

**감사의 글** 이 논문은 경남과학기술대학교 2017년도 대학회계 연구비에 의하여 연구되었음.

## References

- Schmidt AW, Reddy KR, Knölker HJ (2012) Occurrence, biogenesis, and synthesis of biologically active carbazole alkaloids. *Chem Rev* 112: 3193–3328
- Souza AB, Martins CH, Souza MG, Furtado NA, Heleno VC, de Sousa JP, Rocha EM, Bastos JK, Cunha WR, Veneziani RC, Ambrósio SR (2011) Antimicrobial activity of terpenoids from *Copaifera langsdorffii* Desf. against cariogenic bacteria. *Phytother Res* 25: 215–220
- Xiao J, Ni X, Kai G, Chen X (2013) A review on structure-activity relationship of dietary polyphenols inhibiting  $\alpha$ -amylase. *Crit Rev Food Sci Nutr* 53: 497–506
- Ververidis F, Trantas E, Douglas C, Vollmer G, Kretzschmar G, Panopoulos N (2007) Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part I: Chemical diversity, impacts on plant biology and human health. *Biotech J* 2: 1214–1234
- Mora-Pale M, Sanchez-Rodriguez SP, Linhatrdt RJ, Dordick JS, Koffas MAG (2013) Metabolic engineering and *in vitro* biosynthesis of phytochemicals and non-natural analogues. *Plant Sci* 210: 10–24
- Dai J, Mumper RJ (2010) Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15: 7313–7352
- Xingfeng G, Daijie W, Wenjuan D, Jinhua D, Xiao W (2010) Preparative isolation and purification of four flavonoids from the petals of *Nelumbo nucifera* by high-speed counter-current chromatography. *Phytochem Anal* 21: 268–272
- Stachulski AV, Meng X (2013) Glucuronides from metabolites to medicines: a survey of the *in vivo* generation, chemical synthesis and properties of glucuronides. *Nat Prod Rep* 30: 806–848
- Zhou ML, Zhu XM, Shao JR, Tang YX, Wu YM (2011) Production and metabolic engineering of bioactive substances in plant hairy root culture. *Appl Microbiol Biotechnol*. 90: 1229–1239
- Wang Y, Chen S, Yu O (2011) Metabolic engineering of flavonoids in plants and microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 91: 949–956
- Han SH, Kim BG, Yoon JA, Chong Y, Ahn JH (2014) Synthesis of flavonoid *O*-pentosides by *Escherichia coli* through engineering of nucleotide sugar pathways and glycosyltransferase. *Appl Environ Microbiol* 80: 2754–2762
- Gupta M, Zha J, Zhang X, Jung GY, Linhardt RJ, Koffas MAG (2018) Production of deuterated cyanidin 3-*O*-glucoside from recombinant *Escherichia coli*. *ACS Omega* 3: 11643–11648
- Kim MJ, Kim BG, Ahn JH (2013) Biosynthesis of bioactive *O*-methylated flavonoids in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 97: 7195–7204
- Peterson J, Dwyer J (1998) Taxonomic classification helps identify flavonoid-containing foods on a semiquantitative food frequency questionnaire. *J Am Diet Assoc* 98: 677–682
- Graf BA, Milbury PE, Blumberg JB (2005) Flavonols, flavones, flavanones, and human health: epidemiological evidence. *J Med Food* 8: 281–290
- Kim BG, Joe EJ, Ahn JH (2010) Molecular characterization of flavonol synthase from poplar and its application to the synthesis of 3-*O*-methylkaempferol. *Biotechnol Lett* 32: 579–584
- De Meyer N, Haemers A, Mishra L, Pandey HK, Pieters LA, Vanden Berghhe DA, Vlietinck AJ (1991) 4'-Hydroxy-3-methoxyflavones with potent anticoronavirus activity. *J Med Chem* 34: 736–746
- Banskota AH, Tezuka Y, Adnyana IK, Xiong Q, Hase K, Tran KQ, Tanaka K, Saiki I, Kadota S (2000) Hepatoprotective effect of *Combretum quadrangulare* and its constituents. *Biol Pharm Bull* 23: 456–460
- Nazaruk J, Jakoniuk P (2005) Flavonoid composition and antimicrobial activity of *Cirsium rivulare* (Jacq.) All. flowers. *J Ethnopharmacol* 102: 208–212
- Leal LK, Canuto KM, da Silva Costa KC, Nobre-Júnior HV, Vasconcelos SM, Silveira ER, Ferreira MV, Fontenele JB, Andrade GM,

- de Barros Viana GS (2009) Effects of amburoside A and isokaempferide, polyphenols from *Amburana cearensis*, on rodent inflammatory processes and myeloperoxidase activity in human neutrophils. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 104: 198–205
21. Yang SM, Han SH, Kim BG, Ahn JH (2014) Production of kaempferol 3-*O*-rhamnoside from glucose using engineered *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 41: 1311–1318
22. Kim BG, Lee Y, Hur HG, Lim Y, Ahn JH (2006) Flavonoid 3'-*O*-methyltransferase from rice: cDNA cloning, characterization and functional expression. *Phytochemistry* 67: 387–394
23. Jones JA, Vernacchio VR, Lachance DM, Lebovich M1, Fu L, Shirke AN, Schultz VL, Cress B, Linhardt RJ, Koffas MA (2015) ePathOptimize: A combinatorial approach for transcriptional balancing of metabolic pathways. *Sci Rep* 5: 11301
24. Kim JH, Kim BG, Park Y, Ko JH, Lim CE, Lim J, Lim Y, Ahn JH (2007) Characterization of flavonoid 7-*O*-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *Biosci Biotechnol Biochem* 70: 1471–1477
25. Gohari AR, Saeidnia S, Matsuo K, Uchiyama N, Yagura T, Ito M, Kiuchi F, Honda G (2003) Flavonoid constituents of *Dracocephalum kotschy* growing in Iran and their trypanocidal activity. *Natural Medicines* 57: 250–252
26. Sung SH, Kim BG, Ahn JH (2011) Optimization of rhamnetin production in *Escherichia coli*. *J Microbiol Biotechnol* 21: 854–857
27. Cress BF, Leitz QD, Kim DC, Amore TD, Suzuki JY, Linhardt RJ, Koffas MAG (2017) CRISPRi-mediated metabolic engineering of *E. coli* for *O*-methylated anthocyanin production. *Microb Cell Fact* 16: 1–14
28. Hwang EI, Kaneko M, Ohnishi Y, Horinouchi S (2003) Production of plant-specific flavanones by *Escherichia coli* containing an artificial gene cluster. *Appl Environ Microbiol* 69: 2699–2706