

대사공학기술을 이용한 기능성 carotenoids 고 생산 감자의 개발 현황

안미정 · 배정명 · 이신우

Development of transgenic potato with high content of functional carotenoids by using metabolic engineering

Mi-Jeong Ahn · Jung-Myung Bae · Shin-Woo Lee

Received: 18 October 2010 / Accepted: 6 November 2010
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Recently, a number of successful research reports are accumulated to increase the carotenoid level in potato tuber such as β -carotene, precursor of vitamin A and keto-carotenoid like astaxanthin in which is not synthesized in most plants tissue since it does not contain a specific enzyme to add keto-ring in carotenoid molecule. In particular, keto-carotenoids are more interested due to their strong antioxidant activity. Currently, the content of β -carotene was increased up to 3,600-fold ($47 \mu\text{g/g}$ dry weight) when compared to the control potato tuber, parental cultivar for genetic modification. In addition, astaxanthin, one of the major keto-carotenoid was accumulated up to $14 \mu\text{g/g}$ dry weight in potato tuber with red color by over expressing the gene encoding β -carotene ketolase isolated from marine microorganisms. In this article, we summarized carotenogenesis-related genes that have been used for metabolic engineering of carotenoid biosynthetic pathway in potato. Furthermore, strategies for the accumulation of carotenoids and keto-carotenoids in specific potato tuber, bottle necks, and future works are discussed.

M.-J. Ahn · S.-W. Lee (✉)
진주산업대학교, 생명자원과학대학, 농학·한약자원학부
(150, Chiram-dong, JinJu, Department of Agronomy & Medicinal Plant Resources, College of Life Science and Natural Resources, JinJu National University, 660-758, Korea)

J.-M. Bae
고려대학교 생명공학원
(School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Seoul, Korea 136-713)
e-mail: shinwlee@jinju.ac.kr

서론

감자는 전 세계에서 4번째 주식으로 그 소비량이 해마다 증가하고 있다. 특히 감자는 전분의 공급원으로서 주요할 뿐만 아니라, lysine, methionine, tryptophan 등 필수아미노산의 함량이 높은 단백질을 함유하고 있고, 칼슘, 철, 칼륨 등과 함께 비타민 C의 함량도 높아 영양학적으로 그 가치가 높은 것으로 알려져 있다 (Mullins et al. 2006). 그러나 대부분의 재배종 감자의 괴경에는 비타민 A의 전구 물질인 카로티노이드가 합성되지 않거나 그 함량이 아주 낮다. 따라서 최근에는 다양한 분자생물학적 기술의 발달과 함께 감자의 괴경 내에 카로티노이드의 함량을 높이기 위한 연구 결과가 지속적으로 발표되고 있다.

식물의 카로티노이드는 이소프렌 (isoprene: C_5) 구조를 가지는 isoprenyl pyrophosphate (IPP)와 dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP)을 기본단위로 합성된다. 엽록체에서는 2-C-methyl D-erythritol-4-phosphate (MEP) 경로를 통하여 IPP와 DMAPP가 합성되나 세포질에서는 Mevalonate (MVA) 경로로 알려진 생합성과정을 통하여 합성된다 (Ha et al 2003). 세포질에서 합성된 IPP와 DMAPP는 phytosterol의 생합성에 이용되며, 엽록체로 이동되어 카로티노이드를 포함하여 phytosterol, phytoalexin과 gibberelin (GA), Abscisic acid (ABA) 등의 식물호르몬을 합성하는데 이용된다 (Giuliano et al. 2008; Hasunuma et al. 2008). Figure 1에서 간략하게 요약한바와 같이 엽록체의 MEP 경로는 pyruvate와 glyceraldehyde-3-phosphate (GAP)로부터 1-deoxy-D-xylulose-5 phosphate (DXP)를 합성하고 이는 다시 MEP 그리고 IPP를 합성하는 과정을 거치나 세포질에서 일어나는 MVA 경로는 Acetyl CoA가 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG CoA), MVA 그리고 IPP와 DMAPP로 전환된다.

MEP와 MVA 경로를 통하여 합성된 IPP 즉 C₅ 화합물의 순차적인 첨가반응을 통하여 geranyl pyrophosphate (GPP : C₁₀), farnesyl pyrophosphate (FPP : C₁₅), geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP : C₂₀)이 합성된다. GGPP는 phytoene 과 lycopene을 거쳐 다시 두 가지 경로를 거치면서 α-carotene 그리고 β-carotene을 합성한다. 이들은 hydroxylation 과정을 거치면서 zeaxanthin, violaxanthin, neoxanthin 등을

합성한다 (Hirshberg 2001). 특히 최근에는 astaxanthin, 등을 포함한 keto형 carotenoids가 주목을 받고 있는데 이는 항산화성이 토코페롤이나 비타민C 보다 강하지만 식물에서는 일반적으로 합성이 되지 않는 것으로 알려져 있기 때문이다. 주로 새우 등의 물고기나 바다에 서식하는 미생물에서 β-carotene ketolase에 의하여 keto기를 삽입함으로써 합성된다 (Steiger and Sandmann 2004).

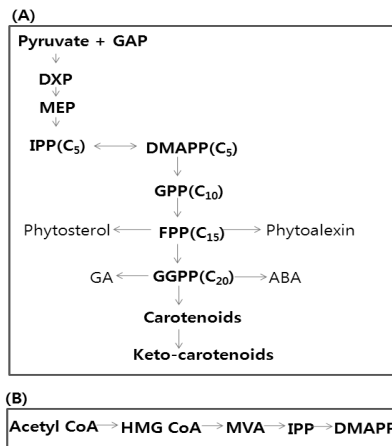


Fig. 1 Brief summary of metabolic pathway involved in the biosynthesis of carotenoid (A) and keto-carotenoids (B). GAP, glyceraldehyde-3-phosphate; DXP, 1-deoxy-D-xylulose-5 phosphate; MEP, 2-C-methyl D-erythritol-4-phosphate; IPP, isoprenyl pyrophosphate; DMAPP, dimethylallyl pyrophosphate; GPP, geranyl pyrophosphate (C₁₀); FPP, farnesyl pyrophosphate (C₁₅); GGPP, geranylgeranyl pyrophosphate (C₂₀); HMG CoA, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA; MVA, mevalonate

이렇게 다양하고 복잡한 카로티노이드 생합성과정에 관여하는 효소들의 기능을 밝히고 이들을 암호 하는 유전자를 클로닝하기 시작하면서 벼, 옥수수, 감자 등의 주곡작물에서 특정 카로티노이드를 집적시키기 위한 대사공학연구가 성공적으로 이루어지기 시작하였다. 최근에는 β-carotene의 함량이 향상된 벼 (golden rice)가 상업화를 위한 포장시험 등 안전성 평가단계에 있어 조만간에 시장에 출시 될 것이라고 한다 (Ye et al. 2000). 따라서 본 논문에서는 다양한 종류의 특정 카로티노이드를 집적시킨 감자의 연구현황을 살펴보고 해결하여야 할 문제점 등을 고찰하여보고자 하였다.

감자내 카로티노이드의 집적을 위하여 사용된 외래 유전자의 현황

현재까지 보고된 연구결과를 통하여 감자의 괴경에 특정 카로티노이드를 집적시키기 위하여 도입한 외래 유전자의 종류를 Table 1에 요약하였다. 생합성대사과정의 가장

Table 1 Carotenogenesis-related genes that have been confirmed to increase the content of carotenoids by transgenic approaches in potato

Genes	Origin (source)	Enzymatic characteristics	Reference
<i>Dxs</i>	<i>E. coli</i>	1-deoxy-D-xylulose-5 phosphate (DXP) synthase, catalyze the first reaction in the methylerythritol phosphate (MEP) pathway to synthesize DXP from glyceraldehyde 3-phosphate and pyruvate	Morris et al (2006a)
<i>Crt B</i>	<i>Erwinia uredovora</i>	Phytoene synthase, conversion of two molecules of geranylgeranyl pyrophosphate to phytoene	Ducreux et al (2005)
<i>Crt B</i>	<i>Erwinia herbicola</i>	Conversion of two molecules of geranylgeranyl pyrophosphate to phytoene	Diretto et al (2007a)
<i>Crt I</i>	<i>Erwinia herbicola</i>	Phytoene desaturase, conversion of phytoene to lycopene	Diretto et al (2007a)
<i>Crt Y</i>	<i>Erwinia herbicola</i>	Lycopene β-cyclase, introducing one or two β-rings into lycopene to generate β-carotene	Diretto et al (2007b)
<i>Lcy-e</i>	Potato	Lycopene epsilon cyclase, introducing a single epsilon-ring into lycopene to generate α-carotene	Diretto et al (2006)
<i>Chy 1</i> and <i>Chy 2</i>	Potato	β-carotene hydroxylase, hydroxylation of β-carotene	Diretto et al (2007b)
<i>Zep</i>	Potato	Zeaxanthin epoxidase, conversion of zeaxanthin into violaxanthin	Römer et al(2002) Lu et al (2006)
<i>Or</i> (DQ482460)	Cauliflower	Triggering the differentiation of proplastids and/or non-colored plastids into chromoplasts	(2007) Lopez et al (2008) Van Eck et al (2010)
<i>CCD4</i>	Potato	Carotenoid cleavage dioxygenase 4, carotenoid cleavage give rise to a wide range of apo-carotenoid products	Campbell et al (2010)

첫 단계 즉 MEP경로의 첫 단계로 pyruvate와 GAP를 이용하여 1-deoxy-D-xylulose-5 phosphate (DXP)를 합성하는 1-deoxy-D-xylulose-5 phosphate synthase (*Dxs*) 유전자를 *Escherichia coli*에서 분리하였으며 이를 감자에 도입하는데 성공하였다 (Morris et al. 2006a). 그리고 GGPP를 phytoene으로 전환하는 반응을 촉매하는 phytoene synthase (*Psy*)를 암호하는 유전자 (*Crt B*)를 *Erwinia uredovora*와 *Erwinia herbicola*로부터 분리하여 감자에 도입한 결과가 발표되었다 (Ducreux et al. 2005; Diretto et al. 2007a). 뿐만 아니라 phytoene을 lycopene으로 전환시키는 반응을 촉매하는 phytoene desaturase (*Pds*)를 암호 하는 유전자 (*Crt I*)와 lycopene에 β -ring을 삽입시켜 β -carotene을 생산하는 반응을 촉매하는 lycopene β -cyclase (*Lcy-b*)를 암호 하는 유전자 (*Crt Y*)를 역시 *Erwinia herbicola*로부터 분리하여 감자에 도입한 결과를 발표하였다 (Diretto et al. 2007a). 한편 α -carotene을 생합성하는 분지과정에서의 첫 단계에 관여하는 lycopene epsilon cyclase 를 암호 하는 유전자 (*Lcy-e*), 그리고 β -carotene의 단계적인 hydroxylation반응을 촉매 하는 β -carotene hydroxylase를 암호 하는 유전자 (*Chy1*, *Chy2*)를 감자로부터 분리하여 감자의 대사공학기술에 응용된 결과도 발표되었다 (Diretto et al, 2006; 2007b). 한편 Rømer 등 (2002)은 zeaxanthin을 violaxanthin으로 전환시키는 반응을 촉매하는 zeaxanthin epoxidase를 암호하는 유전자 (*Zep*)를 감자로부터 분리하여 감자의 괴경내 zeaxanthin의 집적을 유도하기 위한 대사공학기술에 응용하였다. 한편 직접적으로 카로티노이드의 생합성 대사과정에는 관여하지 않지만 색소체의 발달에 관여하

는 유전자 (*Or*)을 Cauliflower로부터 분리하는데 성공하였으며 이를 감자에 도입하여 카로티노이드의 함량을 높이는 데 성공하였다고 보고하였으며 (Lu et al. 2006; Lopez et al. 2008; Van Eck et al. 2010), carotenoid의 분해과정에서 다양한 종류의 apo-carotenoid를 생산하는 carotenoid cleavage dioxygenase 4 (*CCD4*) 유전자를 감자에서 분리하는데 성공하여 감자의 괴경내 carotenoid를 고농도로 집적시키기 위한 대사공학기술에 응용할 수 있었다고 보고하였다 (Campbell et al. 2010).

감자의 괴경 내 특정카로티노이드를 집적시키기 위한 전략

특정 카로티노이드를 감자의 괴경에 특이하게 집적시키기 위하여 다양한 전략이 사용되었다. 첫째는 특정 유전자를 과 발현시키는 방법으로 *Dxs*와 *Crt B* 유전자를 감자의 괴경에 특이하게 발현을 유도하는 *Patatin* promoter와 완두에서 분리한 *rbc S* transit peptide를 이용하여 감자의 괴경내 색소체에 카로티노이드가 집적되도록 하였다. 그 결과 *Dxs* 유전자를 도입한 감자에서 phytoene이 집적되는 것을 확인하였으며 (Morris et al. 2006a), *Crt B*를 과 발현시켜 β -carotene, lutein, violaxanthin, Antheraxanthin의 함량이 증가된 것을 확인하였으며 특히 lutein의 경우 비형질전환체에 비하여 19배나 증가하였다고 보고하였다 (Ducreux et al. 2005).

두 번째 전략은 anti-sense 유전자를 도입하여 특정 유전자의 발현을 down-regulation시키는 방법을 사용하였다.

Table 2 Strategies for the accumulation of specific carotenoid types in transgenic potato

Strategies	Trans-gene	promoter	Targeted organ or tissues	Major carotenoids	Reference
Over-expression	<i>Dxs</i>	<i>Patatin</i>	Plastid in tuber using <i>rbcS</i> TP	Phytoene	Morris et al (2006a)
	<i>Crt B</i>	<i>Patatin</i>	Plastid in tuber using <i>rbcS</i> TP	β -carotene Lutein (19-fold) Violaxanthin Antheraxanthin	Ducreux et al (2005)
Anti-sense	<i>Lcy-e</i>	<i>Patatin</i>	Tuber	β -carotene (14-fold) Total carotenoid (2.5-fold)	Diretto et al(2006)
	<i>Chy 1 and Chy 2</i>	<i>Patatin</i>	Tuber	β -carotene (38-fold) Total carotenoid (4.5-fold)	Diretto et al (2007b)
Anti-sense or co-suppression	<i>Zep</i>	<i>GBSS</i>	Tuber	Zeaxanthin (4 to 130-fold) total carotenoid (5.7-fold)	Rømer et al(2002)
Co-transformation	<i>CrtB +CrtI +CrtY</i>	<i>Patatin</i>	Tuber	β -carotene (3,600-fold) Total carotenoid (20-fold)	Diretto et al (2007a)
RNAi	<i>CCD4</i>	<i>CaMV35S</i>	Constitutive	Violaxanthin (4-fold) Total carotenoid (4-fold)	Campbell et al (2010)
Providing depositing sinks	<i>Or</i>	<i>GBSS</i>	Tuber	total carotenoid (6-fold) phytoene, phytofluene, etc	Lopez et al (2008) Van Eck et al (2010)

Diretto 등 (2006; 2007b)은 *Lcy-e*와 *Chy*유전자의 anti-sense 단편을 *Patatin* promoter에 연결하여 도입한 결과 전자의 경우에는 총 카로티노이드의 함량이 2.5배까지 증가함과 동시에 β -carotene의 함량이 14배 증가하였다고 보고하였으며, 후자의 경우에는 총 카로티노이드의 함량이 4.5배까지 증가하고 β -carotene의 함량이 38배까지 증가하는 획기적인 연구결과를 보고하였다. 이러한 결과는 α -carotene의 생산을 위한 분지과정의 첫 단계에 관여하는 *Lcy-e* 유전자와 β -carotene의 hydroxylation과정을 통하여 그 아래 단계의 zeaxanthin, violaxanthin, antheraxanthin등의 합성을 저해한 결과 전구물질들이 집적된 것으로 사료된다. 이와 유사하게 *Zep* 유전자의 anti-sense 단편을 감자에서 분리한 granule-bound starch synthase 유전자 (*GBSS*)의 promoter에 연결하여 도입한 결과 총 카로티노이드의 함량이 5.7배 증가하였고, zeaxanthin의 함량이 4에서 130배 증가하였다고 보고하였다 (Rømer et al. 2002).

다음으로는 하나 이상의 유전자를 동시에 도입하는 co-transformation기술을 도입한 것으로 *Erwinia herbicola*로부터 분리한 *Crt B*, *Crt I*, 그리고 *Crt Y* 유전자를 *Patatin* promoter를 이용하여 동시에 감자에 도입한 결과 총 카로티노이드의 함량이 20배까지 증가함과 동시에 β -carotene의 함량이 3,600배까지 증가하였다고 하였다 (Direto et al. 2007a). 이 결과는 현재까지 알려진 연구결과로는 가장 성공적인 결과로 밝혀졌다. 뿐만 아니라 황금감자 (golden tuber)라고 불리는 형질전환계통을 대상으로 감자의 괴경 내 carotenoid의 함량을 극대화시키면서 다른 유전자의 전사활동 또는 생합성대사과정에 영향을 미치지 않고 농업적 특성을 변화시키지 않는 최적의 계통을 구명하기 위한 추가적인 연구결과도 발표하였다 (Diretto et al. 2010).

한편 RNAi 기술을 이용하여 *CCD4*를 감자에 도입하여 down-regulation 시킨 결과 괴경 내 총 카로티노이드의 함량이 4배 증가하였으며 특이하게도 violaxanthin의 함량이 4배까지 증가하면서 노란색 속살을 가진 감자를 생산하였다고 보고 하였다 (Campbell et al. 2010). 뿐만 아니라 잎, 줄기, 뿌리 등에서는 카로티노이드의 함량에 변화가 없었으나 petal에서 특이하게 카로티노이드의 함량이 증가하여 노란색으로 변화하였다고 보고하였다.

마지막으로 카로티노이드 등의 화합물을 저장할 수 있는 공간을 보다 많이 제공함으로써 보다 많은 카로티노이드가 집적될 수 있도록 하는 전략이다. 최근에 발표된 연구결과에 의하면 *Or* 유전자를 *GBSS* promoter에 연결하여 도입한 결과 총 카로티노이드 함량이 6배까지 증가하였을 뿐만 아니라 phytoene, phytofluene와 같은 카로티노이드 합성과정의 전구물질이 축적된 것을 보고 하였다 (Lopez et al. 2008; Van Eck et al. 2010). 그러나 잡색체 또는 엽록체의 분화 및 소멸과정 등의 분자생물학적 조절 기작에 관하여 아직은 보다 많은 연구가 이루어져야 하며 특히 빛이 없는 땅속에서 발육하는 감자의 괴경 조직 내에서 *Or* 유전자의 발현과 관련된 생리생화학적인 연구결과가 집적되어야 할 것으로 사료된다.

케토형 카로티노이드의 집적을 위한 대사공학 기술

서론에서 언급한 바와 같이 아스타산틴과 같은 케토형 카로티노이드는 일반적으로 식물은 생산을 하지 않는다. 그 이유는 케토기를 첨부할 수 있는 촉매 기능을 하는 β -carotene ketolase를 암호 하는 유전자가 없기 때문이다. 최근에 β -carotene ketolase유전자가 *Synechocystis*와 *Haematococcus pulvisalis*로부터 분리되어 각각 *Crt O* (Gerjets and Sandmann 2006) 와 *Bkt*로 (Morris et al. 2006b)으로 명명하였다. 케토형 카로티노이드를 감자에 집적시키기 위하여 현재까지는 두 가지 즉 과발현 (over-expression)과 co-transformation 기술이 보고되었다 (Table 3).

첫 번째 전략으로서 *Bkt1* 유전자를 *patatin* promoter와 감자에서 분리한 *Pds*유전자의 transit peptide를 사용하여 도입한 결과 감자에서는 생산이 되지 않는 astaxanthin이 $14 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ dry weight 그리고 keto-lutein이 $9.8 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ dry weight 수준으로 집적되어 감자의 속살이 붉은 색을 나타내었다고 하였다 (Morris et al. 2006b). 두 번째로 *Crt B* 와 *Bkt1* 유전자를 각각 *patatin* 그리고 *rbcS* TP와 *Pds* TP에 연결한 것을 co-transformation시킨 결과 keto-lutein이 $0.6 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, astaxanthin이 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, canthaxanthin이 $0.2 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 수준으로 집적되었다고 보고하여 전술한 *Bkt 1* 유전자만

Table 3 Strategies for the accumulation of specific keto-carotenoid types in transgenic potato

Strategies	Trans-gene	Promoter	Targeted organ/tissue	Major keto-carotenoids	Reference
Over-expression	<i>Bkt1</i>	<i>Patatin</i>	Plastid in tuber using <i>Pds</i> TP	Astaxanthin ($14 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) Keto-lutein ($9.8 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	Morris et al (2006b)
	<i>Crt B</i> + <i>Bkt 1</i>	<i>Patatin</i>	Plastid in tuber using <i>rbcS</i> and <i>Pds</i> TP	Keto-lutein ($0.6 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) Astaxanthin ($0.5 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) Canthaxanthin ($0.2 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	Morris et al (2006b)
Co-transformation	Antisense <i>Zep</i> + <i>Crt O</i>	<i>GBSS</i> <i>CaMV35S</i>	Tuber + constitutive	3'-hydroxy-echinone, 4-keto-zeaxanthin, Astaxanthin	Gerjets & Sandmann (2006)

을 과 발현 시킨 것 보다 매우 낮은 수준으로 나타났다 (Morris et al. 2006b). 마지막으로 anti-sense *Zep* 유전자를 기 도입한 감자에 *Crt O* 유전자를 항시발현 프로모터인 *CaMV35S*를 사용하여 동시에 도입한 결과 3'-hydroxyechinenone, 4-keto-zeaxanthin, astaxanthin의 함량의 집적을 확인하였으나 역시 그 수준은 예상한 것 보다는 낮게 나타난 것으로 보고하였다 (Gerjets and Sandmann 2006).

적 요

감자의 괴경에 비타민 A의 전구물질인 베타 카로텐 또는 항산화활성이 높으나 일반식물에서는 합성되지 않는 astaxanthin과 같은 케토형 카로티노이드의 집적을 위한 연구가 최근 활발하게 진행되고 있다. 현재까지의 연구 결과를 요약하여 보면 β -carotene의 함량이 47 $\mu\text{g/g}$ dry weight으로 대조구에 비하여 3,600배 까지 증가한 결과가 보고되었다. 또한, 해양 미생물로부터 분리한 β -carotene ketolase 유전자를 도입한 감자의 괴경에서 astaxanthin 등의 케토형 카로티노이드의 함량이 최고 14 $\mu\text{g/g}$ dry weight 까지 증가하여 감자의 색깔이 붉은 색으로 변하였다고 보고하였다. 따라서 본 논문에서는 이들 형질전환 감자의 생산을 위하여 도입한 유전자의 종류, 대사공학적 전략, 문제점 및 향후 연구 방향 등에 관하여 논하고자 하였다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린 21사업 (code 200703 01034017)에 의하여 수행되었다.

인용문헌

Campbell R, Ducreux LJM, Morris WL, Morris JA, Suttle JC, Ramsay G, Bryan GJ, Hedley PE, Taylor MA (2010) The metabolic and developmental roles of carotenoid cleavage dioxygenase 4 from potato (*Solanum tuberosum* L). *Plant Physiol.* 154:656-664

Diretto G, tavazza R, Welsch R, Pizzichini D, Mourgues F, Papacchioli V, Bayer P, Giuliano G (2006) metabolic engineering of potato tuber carotenoids through tuber-specific silencing of lycopene epsilon cyclase. *BMC Plant Biol.* 6:13-24

Diretto G., Al-Babili S, Tavazza R, Papacchioli V, Beyer P, Giuliano G (2007a) Metabolic engineering of potato carotenoid content through tuber-specific overexpression of a bacterial mini-pathway. *PLoS ONE* 2(4):e350-doi:

10.1371/journal.pone.0000350

Diretto G., Welsch R, Tavazza R, Mourgues F, Pizzichini D, Beyer P, Giuliano G (2007b) Silencing of beta-carotene hydroxylase increases total carotenoid and beta-carotene levels in potato tubers. *BMC Plant Biol.* 7:11-19

Diretto G., Al-Babili S, Tavazza R, Scossa F, Papacchioli V, Migliore M, Beyer P, Giuliano G (2010) Transcriptional-metabolic networks in β -carotene-enriched potato tubers: the long and winding road to the "Golden" phenotype. *Plant Physiol.* 154:899-912

Ducreux LJM, Morris WL, Hedley PE, Shepherd T, Davies HV, Millam S, Taylor MA (2005) Metabolic engineering of high carotenoid potato tubers containing enhanced levels of b-carotene and lutein. *J. Exp. Bot.* 56:81-89

Gerjets T, Sandmann G (2006) Ketocarotenoid formation in transgenic potato. *J. Exp. Bot.* 57:3639-45

Giuliano G, Tavazza R, Diretto G, Beyer P, Taylor MA (2008) Metabolic engineering of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends in Biotech.* 26:139-145

Ha SH, Kim JB, Park JS, Ryu TH, Kim KH, Hahn BS, Kim JB, Kim YH (2003) Carotenoids biosynthesis and metabolic engineering in plants. *Kor. J. Plant Biotech.* 30:81-95

Hasunuma T, Takeno S, Hayashi S, Sendai M, Bamba T, Yoshimura S, Tomizawa K, Fukusaki E, Miyake C (2008) Overexpression of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase gene in chloroplast contributes to increment of isoprenoid production. *J. Bjosci. and Bioeng.* 105:518-526

Hirschberg J (2001) Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Cur. Opin. Plant Biol.* 4:210-218

Lopez AB, Van Eck J, Conlin BJ, Paolillo DJ, O'Neill J, Li L, (2008) Effect of the cauliflower *Or* transgene on carotenoid accumulation and chromoplast formation in transgenic potato tubers. *J. Exp. Bot.* 59:213-223

Lu S, Van Eck J, Zhou X, Lopez AB, OHalloran DM, Cosman KM

Conlin BJ, Paolillo DJ, Garvin DF, Vrebalov J, Kochian LV, Küpper H

Earle ED, Cao J, Lia L (2006) The cauliflower *Or* gene encodes a *DnaJ* cysteine-rich domain-containing protein that mediates high levels of β -carotene accumulation. *Plant Cell* 18:3594-3605

Morris WL, Ducreux LJM, Hedden P, Millam S, Taylor MA (2006a) verexpression of a bacterial 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase gene in potato tubers perturbs the isoprenoid metabolic network: implications for the control of the tuber life cycle. *J. Exp. Bot.* 57:3007-3018

Morris WL, Ducreux LJM, Fraser PD, Millam C, Taylor MA (2006b) Engineering ketocarotenoid biosynthesis in potato tubers. *Met. Eng.* 8:253-263

Mullins, E, Milbourne D, Petti C, Doyle-Prestwich BM, Meade C (2006) Potato in the age of biotechnology. *Trends Plant Sci.* 11:254-260

Römer S, Lübeck Kauder F, Steiger S, Adomat C, Sandmann

- G (2002) Genetic engineering of a zeaxanthin-rich potato by antisense inactivation and co-suppression of carotenoid epoxidation. *Met. Eng.* 4:263-272
- Steiger S, Sandmann G (2004) Cloning of two carotenoid ketolase genes from *Nostoc punctiforme* for the heterologous production of canthaxanthin and astaxanthin. *Biotech. Letters* 26:813-817
- Van Eck J, Zhou X, Lu S, Li L (2010) Modulation of carotenoid accumulation in transgenic potato by inducing chromoplast formation with enhanced sink strength. *Methods Mol. Biol.* 643:77-93
- Ye X, Al-Babili S, Andreas Klöti A, Zhang J, Lucca P, Beyer P, Potrykus I (2000) Engineering the provitamin A (β-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* 287: 303-305