J Plant Biotechnol (2014) 41:169-179
DOI:http://dx.doi.org/10.5010/JPB.2014.41.4.169
ISSN 1598-6365

Review

식물의 지용성 항산화 물질 생산 증대를 위한 대사공학 연구현황

김은하 · 이경렬 · 김종범 · 노경희 · 강한철 · 김현욱

Metabolic engineering for biofortification of lipophilic antioxidants in plants

Eun-Ha Kim · Kyeong-Ryeol Lee · Jong-Bum Kim · Kyung Hee Roh · Han Chul Kang · Hyun Uk Kim

Received: 8 October 2014 / Revised: 25 October 2014 / Accepted: 27 October 2014
ⓒ Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Intracellular antioxidants include low molecular weight scavengers of oxidizing species, and enzymes which degrade superoxide and hydroperoxides. Such antioxidants systems prevent oxidative damage to cellular component by scavenging free radicals and activated oxygen species. Hydrophobic scavengers are found in cell membrane where they interrupt chain reactions of lipid peroxidation. The three major lipophilic antioxidant classes for human health are carotenoids, vitamin E and coenzyme Q10. The biofortification of staple crops with these lipid soluble antioxidants is an attractive strategy to increase the nutritional quality of human food. Here, we have summarized the biosynthetic pathways of three lipid soluble antioxidants in plants and current status of genetic engineered plants for elevated levels of each lipophilic antioxidant.

서 론

식품에 필수 미네랄과 건강 보조 물질들을 식품에 첨가하는 것을 영양강화(fortification)라 한다. 밀가루와 빵, 시리얼, 낙농식품 등의 영양강화는 산업화된 사회에서 사람들의 영양 불균형의 해소와 건강을 증진시키기 위한 공중건강 정책의 일환이다(Mirmiran et al. 2012). 그러나 개발도상국에서는 비효율적인 식품의 분배 구조와 식품 산업의 미발달 등으로 인하여 영양강화는 잘 시행되지 않고 있다(Writh et al. 2012). 주요 곡물인 벼와 옥수수, 밀은 사람이 소비하는 전체 칼로리의 60%를 차지한다(FAO 2009). 가공된 곡류는 필수 아미노산과 필수 지방산, 비타민 등의 영양분이 부족하기 때문에, 이들 곡류를 주로 섭취하는 지역의 사람들은 영양 결핍이 초래하는 질병의 위험에 노출되어 있다. 특히 개발도상국의 가난한 사람들은 선진국과는 달리 비타민이나 미네랄과 같은 영양 보조제가 첨가된 식품을 쉽게 구입할 수 없기 때문에 영양 결핍으로 인한 질병에 걸릴 확률이 높다(van den Briel et al. 2007). 따라서 필수 영양소와 건강 증진 요소들을 대사공학을 통해 곡류에서 대량 생산되어 축적하는 영양강화 식물의 개발이 이러한 위험에 대한 좋은 해결책으로써 제시되었다(Yuan et al. 2011).

식물에서 영양강화 기술은 필수영양 요소들을 작물이 직접 합성하여 축적할 수 있도록 영양이 풍부한 비료를 사용하여 재배하거나 육종 또는 유전공학을 통하여 필수 영양성분이 강화된 식량 작물을 개발하는 것이다. 식물의 영양강화 연구는 필수 미네랄과 비타민 등에 주로 집중되어 있다(Fitzpatrick et al. 2012). 이들은 체내에서 생리학적 반응의 보조 인자나 전구체로써 중요한 역할을 담당하기 때문에, 이들이 결핍되었을 경우 질병을 유발한다. 개발도상국에서 주로 발생하는 영양소 결핍으로 인한 질병들은 비타민 A와 철, 요오드, 엽산, 비타민C 등과 같이 가공된 곡류에서 미량으로 분포하고 있는 필수 영양소와 관련되어 있다. 또한 어떤 필수 영양소들은 생리학적 대사 과정뿐 아니라 암과 심장질환, 신경퇴행적 장애 등을 유발하는 세포 산화스트레스를 억제하는 항산화제의 기능도 있다. 예를 들어 비타민A는 필수 영양소로서, 육류와 낙농식품에서 레티놀(retinol)이나 식물에서 β-carotene등의 비타민A 전구체(pro-vitamin A)로 섭취된다.

E.-H. Kim · K.-R. Lee · J.-B. Kim · K. H. Roh · H. C. Kang · H. U. Kim (✉)
농촌진흥청 국립농업과학원 농업생명자원부
(Department of Agricultural Biotechnology, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Jeonju 560-500, Republic of Korea)
e-mail: hukim64@korea.kr

비타민A는 눈의 망막에서 시각색소인 로돕신(rhodopsin)으로 전환되며, 유전자 발현의 보조 인자이다. 비타민A는 또한 다른 카로테노이드(carotenoids)와 더불어 항산화제이기도 하다. 비타민C는 여러 효소들의 활성에 보조 인자이며, 비타민E는 단백질 키나아제 활성과 유전자 발현에서 조절 인자의 역할 뿐 아니라 동시에 강력한 항산화제이다. 필수 영양소는 아니지만 식물에서 합성되는 안토시아닌(anthocyanin)과 플라보노이드(flavonoid), 멜라토닌(melatonin)등의 많은 화합물들은 항산화제로서 사람의 건강을 위하여 중요하며, 건강보조제로서 상업적으로 생산되고 있다.

본 총설에서는 식물에 존재하는 다양한 영양강화 성분 중 지용성 항산화 기능이 있는 카로테노이드와 비타민E, 코엔자임 Q_{10}(CoQ_{10})의 대사공학을 통한 식물의 영양강화전략에 대한 연구 현황과 앞으로의 연구 방향을 기술하였다.

지용성 항산화 물질의 세포 보호 기작

Figure 1은 인체에서 활성산소류(reactive oxygen species, ROS)의 형성과 해독 메커니즘이다. 활성산소류는 호기성 생물에서 생리적 반응에 의하여 부산물로서 형성되며, 노화의 진행과 환경적 요인에 의하여 그 양이 급격히 증가한다. 활성산소류는 단백질과 핵산, 세포막 등 세포 구성요소들에 산화 스트레스를 일으킨다. 세포내에는 활성산소류로부터 산화스트레스를 방어하는 항산화 시스템이 있다. Superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase 등의 효소적 항산화 작용과 비타민C, 비타민E, glutathione, uric acid 등의 작은 분자의 항산화 물질들이 있다. 또한 세포내 metal chelator들은 Fe_2^+와 결합함으로써 과산화지질 반응을 저해한다. 효소적 그리고 비효소적 항산화 작용은 서로 협력하여 효과적으로 활성산소류를 제거한다

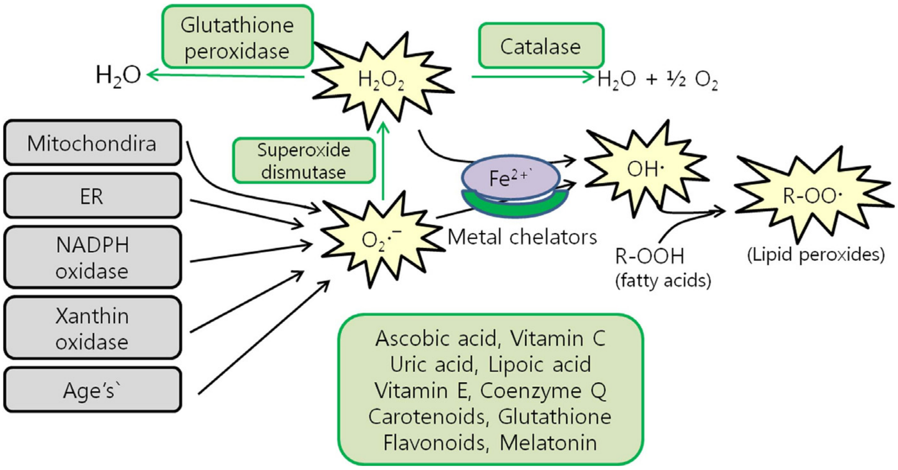

Fig. 1 Mechanism of ROS generation and detoxification in humans. Generation mechanisms of ROS are depicted in grey boxes, while reactive oxygen species are shown in stars. The major enzymes of ROS detoxification are shown in green boxes, and ROS scavenging organic molecules are listed in green box. $O_2\cdot^-$, superoxide; OH·, hydroxyradical; H_2O_2, hydrogen peroxide. Figure 1 was modified from Bashan et al.(2009)

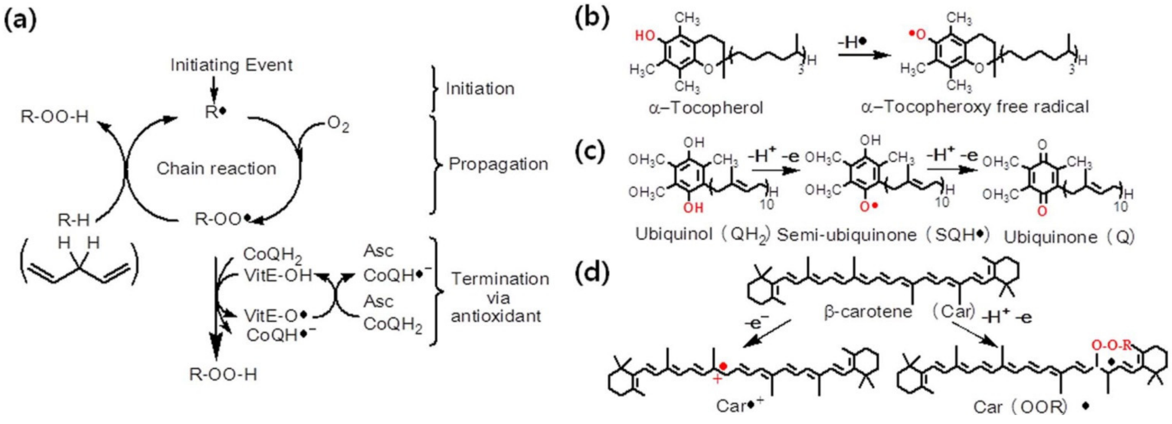

Fig. 2 Structures and scavenging mechanisms of hydrophobic antioxidants. (a) Scheme showing the three phases of the free radical chain mechanism of lipid peroxidation. Scavenging mechanisms of (b) α-tocopherol, (c) Ubiquinol10 (CoQ_{10}) and (d) β-carotene. Figure 2 was based on Burton (1990) and Chaudière and Ferrari-Iiou (1999) with modification. Abbreviations: R·, carbon centered free radical; R-OO·, peroxyl radical; R-OO-H, hydroperoxide; R-H, lipid (poly unsaturated fat)

(Bashan et al. 2009). 일반적으로 작은 분자의 항산화 물질들은 지용성 또는 수용성인데, 수소 원자의 전달과 양성자 전달을 수반하는 홑전자 전달, 순차적 양성자 소실 전자 전달, 라디칼 부산물의 형성 등 항산화 물질들의 분자적 기작은 모두 비슷하다(Gülçin 2012). 카로테노이드와 토코크로마놀, CoQ_{10}은 포유동물의 대표적인 지용성 항산화 물질로써, 모두 터페노이드(terpenoid)로부터 유래된다. 포유동물은 카로테노이드와 토코크로마놀을 주로 음식을 통하여 섭취하며, CoQ_{10}은 많은 단계의 대사 경로를 통하여 체내에서 합성한다.

지용성 항산화 물질들은 주로 과산화지질라디칼(lipid peroxyl radical, $ROO^{\cdot}$)과 일중항산소(singlet oxygen, $^{1}O_2$)로부터 하이드로페록사이드의 형성을 저지함으로써 막에서 일어나는 자유 라디칼 체인(free radical chain)이 중단되도록 한다(Fig. 2a). 비타민E는 수소 원자 전달 기전으로 과산화지질 라디칼을 제거하며, 이 작용으로 생성된 chromanoxyl radical αTO·는 비타민C나 CoQ와 같은 다른 항산화제의 환원 시스템에 의하여 αTOH로 다시 환원된다(Fig. 2b). 환원된 CoQ (H_2)는 양성자 소실과 홑전자를 전달하는 기전으로 비타민E의 재사용에 관여한다(Fig. 2c). 카로테노이드는 전자 전달 기전으로 산화 능력이 있는 자유 라디칼을 제거하고 양이온 라디칼인 $Car^{\cdot+}$를 형성한다. 이후 $Car^{\cdot+}$은 비타민E에 의해 카로테노이드로 환원된다. 또한 카로테노이드는 자신의 이중결합 체인에 직접적으로 자유 라디칼을 붙임으로써 산화 능력이 있는 자유 라디칼을 제거한다(Fig. 2d) (Burton 1990; Chaudieáre and Ferrari-Iliou 1999).

식물 대사 조절 방법

식물의 영양강화 방법으로는 크게 전통 육종법과 대사공학법이 있는데, 두 방법 모두 필수 영양소와 건강 증진 요소들의 효율적인 합성과 축적에 관여하는 대사관련 유전자들을 발현하는 식물체를 만드는 것이 목적이다. 전통 육종법은 최고의 영양형질을 지닌 식물들을 교배하여 여러 세대를 거쳐 더 나은 형질을 가진 식물을 선발하는데, 돌연변이화 또는 영양형질과 연관된 표지를 이용한 선발 등 생명공학을 이용하기도 한다. 대사공학법은 재조합된 DNA를 이용하여 형질을 도입하여 한 세대 후 최고의 영양형질을 나타내는 식물을 선발한다. 전통 육종법은 이용 가능한 유전자들이 교배가 가능한 식물들에 한정적인 반면 대사공학법은 식물간의 불화합성을 초월

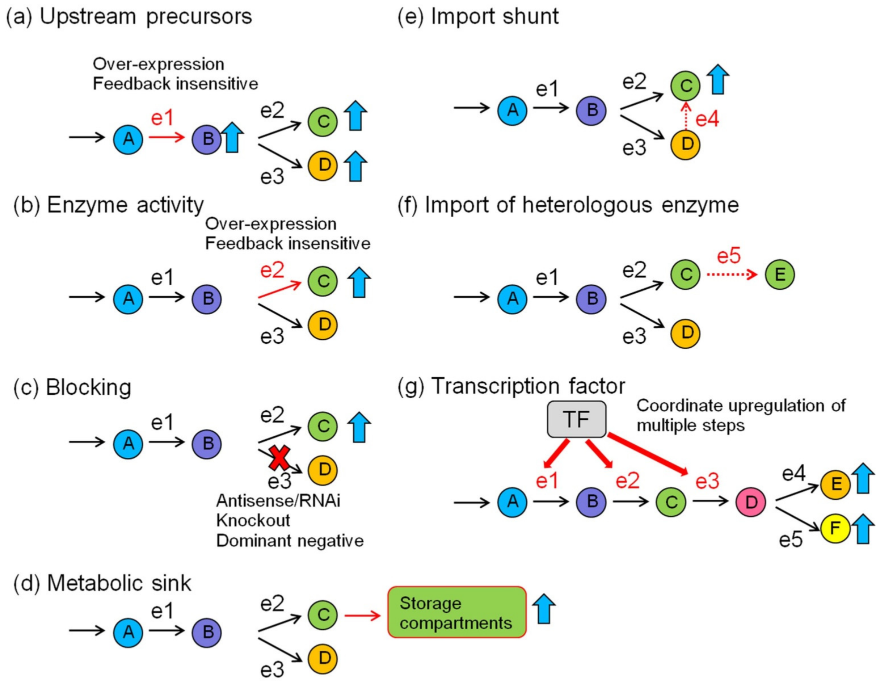

Fig. 3 Approaches to modulate organic compound levels and composition in plants. These strategies comprise the modification of: (a) upstream precursors to increase flux through the pathway by overexpressing the enzyme that catalyzes the first committed step of the target pathway (e1); (b) activity of enzymes implicated in rate limiting steps in target pathways by modulation of one or two key enzymes or multiple enzymes (e2); (c) pathway branch points by blocking and relieving feedback inhibition by RNA interference or antisense (e3); (d) enhancement of accumulation of target metabolites by increasing sink compartments to store target compounds; (e) redirection of the competing pathway to the wanted direction by importing shunt (e4); (f) importing of novel enzymes to extend the endogenous pathway to increase a desired compound (e5); (g) up-regulation of several enzymes coordinately using a transcription factor. Solid arrows represent endogenous metabolism and broken arrows represent heterologous metabolism. Figure 3. is based on Zhu et al. (2013) and Capell and Christou (2004) with modification

하여 목적 유전자를 식물에 직접적으로 도입시킬 수 있으며, 또한 원하는 특정 기관에서 형질이 발현되도록 조절이 가능하고, 맞춤형 영양형질을 가진 식물체를 개발할 수 있는 장점이 있다.

카로테노이드와 토코크로마놀, 비타민C, 플라보노이드 등의 항산화 물질은 식물체 내에서 합성되는데, 유전공학적 방법을 통해 식물에 내재되어 있는 대사 경로를 조절함으로써 목적 영양성분의 합성량을 향상시킬 수 있다(Capell and Christou 2004; Zhu et al. 2013). Figure 3은 식물에서 영양형질 개선을 위해 사용될 수 있는 대사공학적 방법에 대한 개요이며, 각 방법의 전략은 다음과 같다. (a) 전체 대사 경로에서 대사 전구물질이 충분하게 공급될 수 있도록 여러 단계의 효소들을 과발현 한다(Zhu et al. 2008). (b) 알려진 속도 제한 효소를 과발현함으로써 대사경로의 병목 현상을 완화시킨다. 특히 대사 과정이 그 산물에 의하여 방해를 받지 않는 효소를 사용하는 것이 바람직하다(Enfissi et al. 2005; Morris et al. 2006). (c) 특정 대사 물질을 생산하기 위하여 같은 기질을 사용하는 다른 대사 경로를 억제한다(Diretto et al. 2006; Yu et al. 2008). (d) 안정적으로 원하는 산물을 축적하기 위하여 대사 산물을 저장할 수 있는 저장소(metabolic sink)를 만들어 피드백 억제를 감소시켜 생산을 증진시킨다(Lopez et al. 2008; Lu et al. 2006). (e) 다른 경로의 분화 되어 생산된 산물을 원하는 산물로 전환할 수 있는 효소를 발현한다. (f) 식물체에 존재하지 않는 대사경로를 외부 효소의 도입으로 원하는 물질을 생산한다(Mann et al. 2000). (g) 대사에 관여하는 여러 유전자들의 발현을 동시에 유도할 수 있는 전사 인자를 이용하여 목적 물질의 생산을 증진한다(Kawaoka et al. 2001).

카로테노이드 영양강화

카로테노이드는 식물과 곰팡이, 박테리아, 조류 등 광합성 생물에서 합성되는 테트라터페노이드(C40: 탄소길이가 40개)이며, 분자내 산소 유무에 따라서 carotene과 xanthophylls로 나뉜다. 식물에서 카로테노이드 대사공학의 주요 목

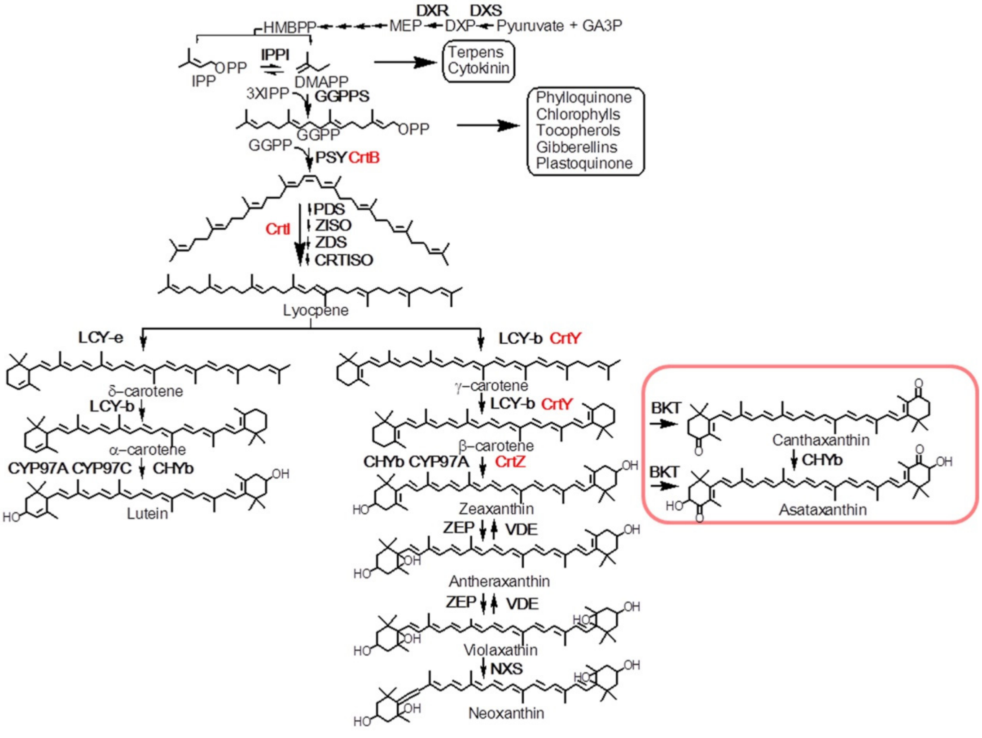

Fig. 4 Carotenoid biosynthetic pathway of plants and equivalent steps in bacteria. Enzymes are in bold and equivalent enzymes of bacteria are in red. Broken lines represent alternative pathways that compete for carotenoid precursors. Biosynthetic pathway to astaxanthin in transgenic plant expressing a heterologous BKT is shown in pink box. Abbreviations: BKT, β-carotene ketolase; CrtB, bacterial phytoene synthase; CrtI, bacterial phytoene desaturase; CRTISO, carotenoid isomerase; CrtY, bacterial lycopene β-cyclase; CrtZ, bacterial β-carotene hydroxylase; CYP97A, heme-containing cytochrom P450 carotene β -ring hydroxylase; CYP97C, heme-containing cytochrome P450 carotene ε-ring hydroxylase; DMAPP, dimethylallyl diphosphate; DXP, 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate; DXR, DXP reductoisomerase; DXS, DXP synthase; GA3P, glyceraldehyde 3-phosphate; GGPP, geranylgeranyl diphosphate; GGPPS, GGPP synthase; CHYb, non-heme di-iron β-carotene hydroxylase; IPP, isopentenyl diphosphate; IPPI, IPP isomerase; LYC-b, lycopene β-cyclase; LYC-e, lycopene ε-cyclase; MEP, methylerythritol 4-phosphate; NXS, neoxanthin synthase; PDS, phytoene desaturase; PSY, phytoene synthase; VDE, violaxanthin de-epoxidase; ZDS, ζ-carotene desaturase; ZEP, zeaxanthin epoxidase; ZISO, ζ-carotene isomerase

적은 주요 작물인 벼와 옥수수, 감자, 카사바 등에서 비타민A 전구체인 β-carotene의 함량 증가이다. 또한 lycopene과 lutein, zeaxanthin, astaxanthin 등 항산화 효과를 나타내는 카로테노이드의 함량 증대에 대한 연구가 진행되고 있다. Lycopene은 토마토에 있는 붉은 색소이며 심장질환과 여러 암에 걸릴 확률을 줄여주는 것으로 보고되어 있다(Fraser and Bramley 2004). Lutein은 녹색 채소에 아주 풍부하며, zeaxanthin은 고추나 특정 옥수수 품종 등에 분포하고 있다. 특히 zeaxanthin은 눈의 수정체와 황반에 중요한데, 고에너지인 청색광을 걸러주고 산화 스트레스를 감소시킴으로써 노화에 따른 황반 변성이 일어나지 않도록 한다(Fraser and Bramley 2004). Astaxanthin은 동물 실험에서 면역 기능을 향상시키고 구강암과 유방암의 성장을 감소시키는 것으로 보고되었다(Tanaka et al. 1995; Chew et al. 1999).

Figure 4는 식물에서 카르테노이드 생합성 경로와 이에 상응하는 박테리아 효소들을 나타내고 있다. 카로테노이드는 엽록체 내에서 glyceraldehydes-3-phosphate (GA3P)와 pyruvate를 첫 기질로 이용하여 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) 경로를 통하여 합성되는 geranlygeranly diphsophate (GGPP)로부터 만들어진다. 두 분자의 GGPP는 phytoene synthase (PSY)에 의해 첫 카로테노이드인 phytoene으로 합성되고 phytoene desaturase (PDS)에 의해 ζ-carotene으로 전환된다. 이후 불포화(desaturation)과정을 거쳐 lycopene이 형성된다. Lycopene은 카로테노이드 합성 경로에서 마지막 공통 전구물질로써 beta cyclase (LCY-b/CrtY)와 epsilon cyclase (LCY-e)가 이에 대하여 경쟁적으로 반응하여, 궁극적으로 각각 β-carotene과 α-carotene을 생산한다. 이 후 carotene hydroxylase에 의해 각각 zeaxanthin과 lutein이 합성된다.

카르테노이드 대사공학에서 주요 포인트는 PSY/CrtB와 이후 네 종류의 효소에 의한 불포화와 이성질체화(isomerization) 과정이다. 박테리아에서는 네 종류의 효소 대신 phytoene desaturase (CrtI)에 의해 이 모든 과정이 일어나기 때문에, 식물의 대사공학에 유용하게 쓰인다. 카로테노이드 대사공학을 통하여 카로테노이드의 합성량 증가와 새로운 카로테노이드의 합성 등의 연구 결과들이 발표되었다.

카로테노이드 생산을 증진하기 위하여 여러 방법들이 있는데, 그 중 유용한 접근법은 PSY/CrtB를 과발현시킴으로써, 합성경로의 병목 현상을 완화시키는 것이다. 그 예로 캐놀라에서 종자 특이적이적 CrtB의 과발현은 종자에서 주로 α-carotene과 β-carotene의 양을 증대시킴으로써 전체 카로테노이드 함량을 50배 증진하였다(Shewmaker et al. 1999). 이 결과는 작물에서 카로테노이드의 함량을 증가시킨 획기적인 사례였다. 카로테노이드의 합성이 phytoene 단계 이후에 작용하는 효소들에 의하여 제한을 받지 않고 phytoene 이후의 다른 카로테노이드로 모두 전환되었음을 보여줬다. 그러나 벼의 배유에서 수선화 PSY의 발현은 이 후의 불포화 과정의 한계 때문에 phytoene만 축적하였다(Burkhardt et al. 1997; Schaub et al. 2005). 이는 벼 종자에서 카로테노이드의 함량을 증대시키기 위해서는 합성경로에 필요한 여러 유전자를 같이 발현시켜야 함을 시사하였다. 이 연구를 바탕으로 벼에서 수선화 PSY와 박테리아 CrtI의 동시 발현은 β-carotene과 zeaxanthin을 생산하는 ‘golden rice’를 탄생시켰다(Ye et al. 2000). 이는 CrtI에 의해 생성된 lycopene이 벼에 내재되어 있는 lycopene β-cyclase (CrtY)와 β-carotene hydroxylase (CrtZ)에 의해 이후 카로테노이드로 전환되었음을 의미한다(Schaub et al. 2005). 이 후 수선화 PSY를 옥수수 PSY로 교체하였을 때, β-carotene의 함량이 17배 증가한 ‘golden rice 2’가 제작되었다(Paine et al. 2005).

성공적으로 카로테노이드의 양를 조절하기 위해서는 조직 특이적인 유전자 발현이 중요하다. 예를 들어, 토마토 PSY1을 지속적으로 발현하는 토마토 형질전환체는 GGPP의 형성이 억제되어 지베렐린의 부족으로 인하여 궁극적으로 키가 작은 표현형을 보였다(Fray et al, 1995). 이 문제는 열매에서 특이적으로 박테리아 CrtB를 발현시킴으로써 해결되었다(Fraser et al. 2002). 또한 카로테노이드 합성을 증대시키기 위해서, phytoene 이전의 경로를 조절하여 더 많은 전구체를 카로테노이드 합성 경로로 제공하려는 연구가 진행되었다. 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) synthase (DXS)를 과발현하여 MEP 경로에 DXP의 량을 증대시켰지만, 동시에 같은 전구체를 이용하는 다른 경로들 또한 증가하여 이 방법은 덜 효율적이고, 직접적인 영향을 미치지 못했다(Enfissi et al. 2005).

카로테노이드 조성은 내재된 상호 경쟁적인 경로의 카로테노이드 생합성 효소들을 억제함으로써 조절될 수 있다. 예를 들어 감자에서 LCY-e를 억제하였을 때, β-carotene의 양이 14배, 전체 카로테노이드의 양이 2.5배 증가하였다. 그러나 lutein의 양은 β-carotene과 상응하여 감소하지 않은 것으로 보아, LCY-e는 속도 제한 단계는 아니다(Diretto et al. 2006). 감자에서 β-carotene hydroxylase (CHYb)의 억제는 β-carotene이 zeaxanthin으로 전환되는 것을 억제함으로써 β-carotene이 38배 증대, lutein이 3.7배 증대, zeaxanthin이 0.5배 감소되었다(Diretto et al. 2007). 그 다음 합성 단계인 zeaxanthin을 violaxanthin으로 전환하는 zeaxanthin epoxidase를 억제하였을 때 전체 카로테노이드가 5.7배, β-carotene은 3.4배, lutein은 1.9배, zeaxanthin은 130배가 증가하였다(Römer et al. 2002). 이러한 연구 결과는 대사공학에 의해 영양학적 가치가 높은 채소를 생산할 가능성을 시사한다.

마지막으로, 식물에서 β-carotene과 전체 카로테노이드 양의 증가 방법은 저장 장소의 개수를 증가시키는 것이

다(Lopez et al. 2008; Lu et al. 2006; Li and Van ECK 2007). 콜리플라워(cauliflower) *Or* 유전자는 흔치 않게 β-carotene을 많이 축적하는 돌연변이체에서 분리되었다. 이 유전자는 DnaJ cysteine-rich domain 단백질을 만드는데, 원색소체(proplastid)나 무색의 색소체(non-colored plastid)가 카로테노이드를 축적하는 저장소인 잡색체(chromoplast)로 분화되도록 개시한다(Lu et al. 2006). 감자의 granule-bound starch synthase (GBSS) 프로모터 조절하에서 *Or* 유전자를 감자에서 발현시켰을 때, 감자 튜뷸이 밝은 오렌지 색을 띄었으며 대조군에서 관찰되지 않는 β-carotene이 건물중(DW) 3.75 μg/g 축적되었고 전체 카로테노이드의 양은 6배 증가하였다(Lopez et al. 2008).

위의 몇 가지 예들에서 언급되었듯이 식용 식물에 외부 유전자의 도입은 원래 생산되고 있는 카로테노이드의 생산을 증대시키거나 카로테노이드 조성을 바꿀 수 있다. 그러나 'golden rice'의 경우처럼, 카로테노이드를 합성하지 않는 조직에서는 카로테노이드 합성 유전자 전체를 형질전환해야 한다. 이와 유사하게 대부분의 식물은 astaxanthin과 canthaxanthin과 같은 ketocarotenoid를 합성하지 않는다. ketocarotenoid는 주로 해양생물에 존재하며 ketocarotenoid의 하이드록실(hydroxyl) 그룹과 키토(keto) 그룹에 의해 여느 카로테노이드보다 뛰어난 항산화제 활성을 보인다. 옥수수 배유에서 박테리아의 β-carotene ketolase의 발현은 astaxanthin을 합성할 수 있는 옥수수 계통을 개발하였다(Zhu et al. 2008). 또한 *Haematococcus pluvialis*에서 분리한 β-carotene ketolase를 당근에서 발현시켰을 때, β-carotene 양의 증가와 더불어 astaxanthin이 합성되었다(Ahn et al. 2012). 이러한 형질전환체는 수산 양식과 건강 보조식품, 화장품 등의 산업에 유용한 자원이 될 수 있다.

Tocochromanol 영양강화

토코페롤(Tocopherol)과 토코트리에놀(Tocotrienol)은 광합성 생물체에서만 합성되며, 비타민E 그룹(Tocochromanol)에 속한다. 각각 토코페롤과 토코트리에놀은 크로마놀의 메틸레이션된 정도에 따라서 α-, β-, γ-, δ- 네 종류로 존재하며, 토코페롤과 토코트리에놀의 차이는 farnesyl isoprenoid tail의 포화 정도이다. 토코트리에놀은 세 개의 이중결합이 존재하여 불포화 사이드 체인을 가지고 있는 반면, 토코페롤은 포화 사이드 체인을 가지고 있다. 토코크로마놀은 주로 식물의 잎과 유지종자로부터 섭취될 수 있다. 비타민E는 크로만 링(chroman ring)에 있는 하이드록시기(OH)의 수소원자를 공여함으로써 자유 라디칼을 환원시킬 수 있으며, 소수성 사이드 체인은 항산화 효과는 없지만 토코페롤이 막에 위치할 수 있도록 한다. 모든 비타민E 구성원들은 뛰어난 지용성 항산화제이지만, 특히 α-tocopherol은 체내에서 가장 잘 흡수되기 때문에 본질적으로 토코크로마놀 중에서 가장 효과적인 비타민E 활성을 보인다(Brigelius-Flohe and Traber 1999).

Figure 5는 식물에서 비타민E의 생합성 경로이다. 토코크로마놀은 엽록체 내막에서 shikimate 경로와 MEP 경로에 의해서 합성된 전구체로부터 만들어진다. 토코크로마

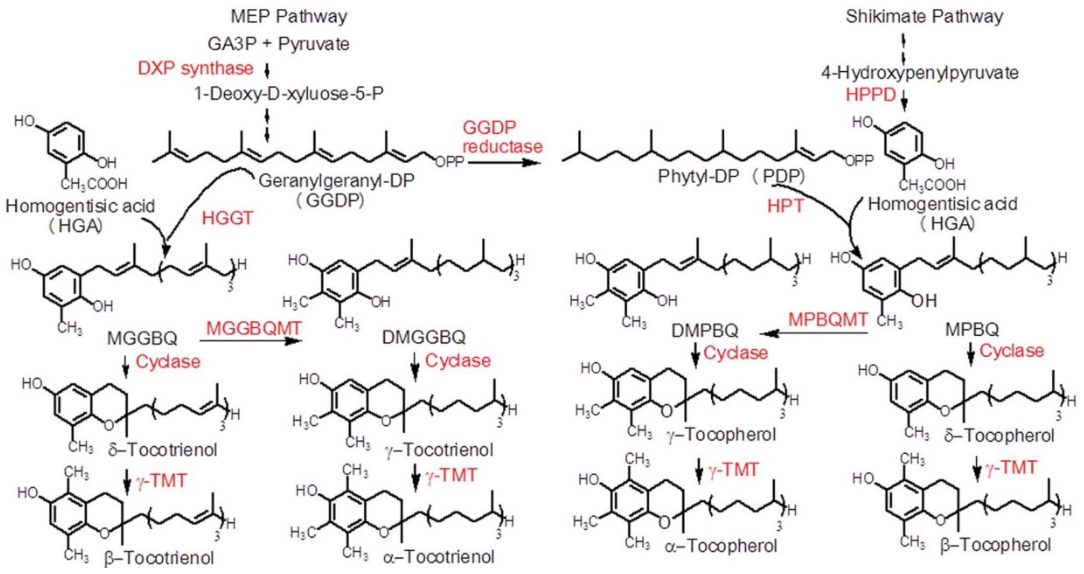

Fig. 5 Vitamin E biosynthesis in plants. Enzymes are in red. Abbreviation: DMGGBQ, 2-dimethyl-6-geranylgeranylbenzoquinol; DMPBQ, 3-dimethyl-5-phytyl-1,4-benzoquinone; GGDP, geranylgeranyl diphsophate; HGGT, homogentisate geranylgeranyl transferase; HPPD, ρ-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase; HPT, homogentisate phytyltransferase; MGGBQ, 2-methyl-6-geranylgeranyl-benzoquinol; MGGBQMT, MGGBQ methyltransferase; MPBQ, 2-methyl-6-phytyl benzoquinone; MPBQMT, MPBQ methyltransferase; PDP, phytyldiphosphate; γ-TMT, γ-tocopherol methyltransferase. See Figure 4 legends for other abbreviations

놀의 머리 그룹인 homogentisic acid (HGA)는 shikimate 경로를 통해서, 그리고 사이드 체인 phytyldiphosphate (PDP)와 geranlygeranyldiphsophate (GGDP)는 MEP 경로에 의해 합성된다. 토코크로마놀의 생합성 반응에서 첫 비가역적 반응은 ρ-hydroxyphenylpyruvic acid (HPP)가 ρ-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase (HPPD)에 의하여 HGA로 전환되는 것이다. HGA는 사이드 체인 PDP와 결합하여 중간물질인 2-methyl-6-phytylbenzoquinol (MPBQ)으로 합성되면서, 토코페롤의 합성경로가 시작된다. 한편 HGA가 다른 사이드 체인 GGDP와 결합하여 중간물질 2-methyl-6-geranylgeranylbezoquinol (MGGBQ)로 합성되면, 토코트리에놀의 합성경로가 개시된다. MPBQ와 MGGBQ가 각각 methyltransferase에 의해 두 번째 메틸 그룹이 첨가되어 중간물질인 3-dimethyl-5-phytyl-1,4-benzoquinol (DMPBQ)와 2-dimethyl-6-geranylgeranylbenzoquinol (DMGGBQ)로 전환된다. 이들 네 개의 중간물질 모두는 tocopherol cyclase의 기질이 되어 각각 δ-tocopherol과 γ-tocopherol, 그리고 δ-tocotrienol과 γ-tocotrienol으로 전환된다. 마지막으로 γ-tocopherol methyltransferase (γ-TMT)는 위의 토코페롤과 토코트리에놀의 두 번째 고리에 메틸 그룹을 첨가함으로써, α-tocopherol과 β-tocopherol, 그리고 α-tocotrienol과 β-tocotrienol이 합성된다.

토코크로마놀의 생합성 경로의 효소들은 카로테노이드 대사공학과 마찬가지로 flux의 조절에 중요한 up-stream 효소들과 토코크로마놀의 구성 요소의 함량을 조절하는 down-stream 효소들, 두 그룹으로 나뉜다. 비타민E의 대사공학에서 flux를 조절할 수 있는 첫 단계는 HGA를 합성하는 HPPD와 PDP의 전구체인 GGDP를 합성하는 GGDPR 효소의 과발현이다. 애기장대와 담배에서 HPPD를 과발현하였을 때, 잎과 종자에서 토코페롤의 양은 각각 10%와 30%가 증가하였다(Tsegaye et al. 2002; Falk et al. 2003). 또한 DXP synthase (deoxyxylulose phosphate synthase)의 과발현은 잎에서 토코페롤의 양을 40% 증대하였다(Estévez et al. 2001). Flux를 조절하는 또 다른 효소는 HGA와 PDP의 결합시켜 MPBQ를 합성하는 HPT이다. 애기장대에서 HPT의 활성이 10배 증가하였을 때, 잎에서 전체 토코페롤의 양은 4.4배 증가하였다(Collakova et al. 2003). HGGT는 프레닐 기질로서 PDP 대신 GGDP를 이용하여 HGA와 결합 반응을 일으켜 토코트리에놀의 경로를 시작하는 효소이다. 따라서 HGGT의 과발현은 토코트리에놀 합성 경로가 증진될 것으로 추측된다. 실제로 HGGT가 과발현된 옥수수 종자에서 토코트리에놀의 함량이 20배 증가하였다(Cahoon et al. 2003).

반면 MPBQ-MT와 γ-TMT와 같은 down-stream의 효소들의 발현은 전체 토코크로마놀의 양에는 영향을 미치지 않으면서 비타민E의 종류들을 상호전환시키는 효과가 있다. 예를 들어 애기장대 MPBQ-MT를 대두에서 종자 특이적으로 발현시켰을 때, 전체 토코크로마놀의 양은 미비하게 증가하였지만, γ-tocopherol이 전체 토코페롤의 75-80%를 차지할 정도로 많이 축적되었다(Van Eenennaam et al. 2003). 애기장대 종자는 대부분의 유지 종자처럼 α-tocopherol의 축적은 미비한 반면 이의 전구체인 γ-tocopherol이 대량 축적된다. 애기장대 γ-TMT를 종자 특이적인 당근의 DC3 프로모터의 조절하에서 과발현시켰을 때, 대부분의 γ-tocopherol은 α-tocopherol로 전환되어 전체 토코페롤의 85-95%를 차지하였다(Shintani and DellaPenna 1998). 그러나 전체 토코페롤의 양은 대조군과 유사하였다. 따라서 비타민E의 활성이 가장 뛰어난 α-tocopherol을 우선적으로 대량 축적하기 위하여 γ-TMT와 up-stream의 유전자를 과발현하여 flux를 증대하고 α-tocopherol로 전환시키는 연구가 진행되었다. 애기장대 MPBQ-MT와 γ-TMT를 동시에 과발현한 대두 형질전환체는 α-tocopherol의 양이 8배 정도 증가하였고, 전체 토코페롤의 95% 이상을 차지하였다(Van Eenennaam et al. 2003). 상추에서 애기장대 HPT와 γ-TMT를 동시에 과발현한 경우, 대조구에 비하여 전체 토코페롤의 양은 6배 증가하였으며, γ-tocopherol에 대한 α-tocopherol의 비율도 6배 증가하였다(Li et al. 2011). 옥수수 종자에서 애기장대 HPPD와 MPBQ-MT의 동시 발현은 γ-tocopherol의 양을 세 배 정도 증가시켰다. 그러나 옥수수 종자에서 낮은 γ-TMT 활성으로 인하여 α-tocopherol로의 전환은 일어나지 않은 것으로 보인다. 따라서 위의 두 효소와 함께 γ-TMT를 동시 발현시킨다면 α-tocopherol의 양의 증대를 기대할 수 있을 것이다(Naqvi et al. 2011).

CoQ_{10}의 영양강화

지용성 항산화 물질의 대사공학은 필수 영양소인 카로테노이드와 토코크로마놀에 상당한 중점을 두어서 이루어져 왔다. 그러나 최근 CoQ의 유익함이 알려지면서 그 양을 증대시키기 위한 대사공학적 전략이 개발되고, 또한 영양 보조제와 화장품으로 산업화되고 있다. CoQ는 미토콘드리아의 호흡체인에서 전자전달 물질로서 필수적인 요소이며, 환원된 형태의 CoQ (H_2)는 강력한 항산화제로써 산화 스트레스로부터 막을 보호해준다. CoQ_{10}은 인체에서 합성되는 대표적인 지용성 항산화 물질이다. 더 많은 양의 CoQ_{10}은 사람의 심장 질환과 신경 장애, 특정 암을 예방하는 것으로 제안되었으며, 아동의 심부전증 치료제로서 사용되고 있다(Dhanasekaran and Ren 2005).

CoQ는 모든 유기체에서 발견되기 때문에 유비퀴논이라고도 불린다. CoQ는 benzoquinone ring과 다양한 길이의 이소프레노이드 체인으로 이루어져 있다. 이소프레노이드 체인의 구성단위인 이소프렌의 개수에 따라서 그 이름이 결정되고, 유기체에 따라 그 길이가 다양하다. CoQ

의 항산화 기능이 발표되면서, CoQ_{10}을 내재적으로 합성하는 아그로박테리움(*A. tumefaciens*)과 로도박테리움(*R. sphaeroides*)등에서 CoQ_{10}의 대량생산을 위한 산업화가 이미 시작되었다(Yoshida et al. 1998). CoQ_{10}의 대량 생산을 위해 널리 쓰이는 방법은 화학적 돌연변이화와 대사공학이다(Jeya et al. 2010; Ndikubwimana and Lee 2014). 대장균(*E.coli*)과 효모(*S. cerevisiae*)는 각각 CoQ_8과 CoQ_6를 내재적으로 생산하는데, 대사공학을 통하여 대사 경로를 조작함으로써 CoQ_{10} 생산이 가능하다(Lee et al. 2004; Kawamukai et al. 2009). 그러나 박테리아에서는 CoQ_{10}의 생산량이 낮고 비용이 많이 들어가기 때문에 이를 대체할 다른 방법이 필요하다. 작물에서 CoQ_{10}의 영양강화는 정제 과정을 거치지 않고 CoQ_{10}을 식용으로 섭취함으로써 비용 절감과 친환경적이라는 장점이 있다. 대장균과 아그로박테리움에서 CoQ_{10}의 합성량을 증대시키기 위하여 연구된 효소들과 조절 메커니즘은 식물에서 이에 해당되는 효소들에 적용될 수 있을 것으로 사료된다.

사람은 CoQ_{10}을 합성하는 반면 대부분의 주요 작물들은 주로 CoQ_9를 만든다(Kamei et al. 1986). Figure 6은 식물에서 CoQ_9의 합성 경로이다. 일반적으로 CoQ_9의 합성은 세 부분으로 이루어져 있는데, quinoid ring과 solanesyl diphosphate (SPP)의 합성과 이들의 결합 후에 일어나는 quinoid ring의 modification이다. 식물에서 SPP의 합성에 관여하는 효소들은 규명되었지만, quinoid ring과 이후 modification에 관여하는 효소들에 대해서는 아직 더 연구가 필요하다. Quinoid ring은 shikimate 경로에서 만들어진 chorismate가 4-hydroxybenzoate (ρ-HBA)으로 전환됨으로써 형성된다. 식물에서 SPP는 여느 이소프레노이드의 합성처럼 세포질의 MVA 경로와 엽록체의 MEP 경로에 의해 만들어지는 IPP와 DMAPP의 결합으로부터 시작된다. CoQ_9의 합성에는 MVA 경로에서 만들어진 farnesyl diphosphate (FPP)와 6개의 IPP가 SPP synthase (SPS)에 의해 연속적으로 결합되어 만들어진 SPP가 사용된다. 반면 엽록체에서 합성되는 SPP는 플라스토퀴논의 합성에 이용된다. ρ-HBA와 SPP의 결합이 4-hydroxybenzoate polyprenyl diphosphate transferase (PPT)에 의해 일어나며, CoQ의 합성 경로에서 이 단계가 비가역적 반응이라 할 수 있다. 이후 quinoid ring은 탈탄산(decarboxylation)과 수산화(hydroxylation), 메틸화(methylation) 반응을 거쳐 CoQ_9이 형성된다.

식물에서 CoQ_{10}의 영양강화의 중요한 연구 성과로는 *Gluconobacter suboxydans*으로부터 분리한 decaprenyl diphosphate synthase 유전자(*DdsA*)를 미토콘드리아로 이동하도록 조작하여 해당 유전자들과 함께 벼(Oryza sativa, Nipponbare)에서 발현한 것이다. DdsA는 FPP를 기질로 7개의 IPP를

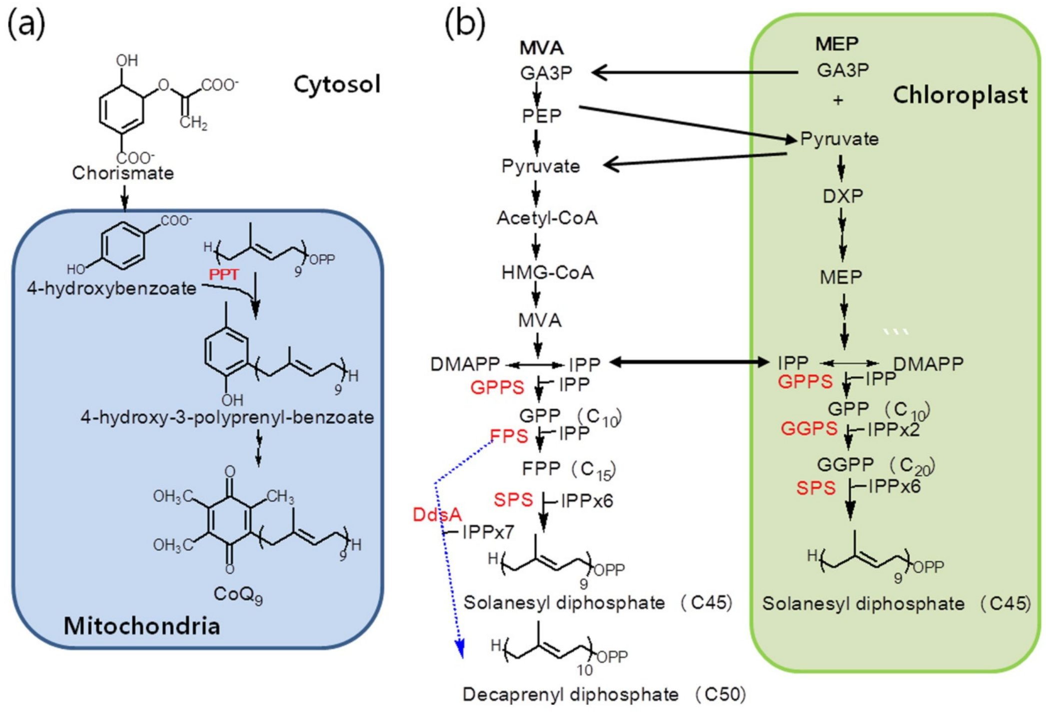

Fig. 6 Ubiquinone 9 (CoQ_9) biosynthesis in plants. (a) CoQ_9 biosynthesis. (B) Isoprenoid biosynthesis in cytosol and chloroplast. DdsA isolated from *G.suboxydans* which catalyze the synthesis of decaprenyl diphosphate by sequential condensation step using FPP and IPP for plant biofortification of CoQ_{10} was shown in blue broken arrow. Abbreviation: DdsA, decaprenyl diphosphate synthase; FPP, fanesyl diphosphate; FPS, FPP synthase; GPP, geranyl diphosphate; GPPS, GPP synthase; HMG-CoA, 3-hydroxyl-3-methylglutary-CoA; MVA, mevalonate; PEP, phosphoenolpyruvate; PPT, 4-hydroxybenzoate polyprenyl diphosphate transferase; SPS, solanesyl diphosphate synthase. See Figure 4 legends for other abbreviations

연속적으로 결합하여 CoQ_{10}의 프레닐 사이드 체인 decaprenyl diphosphate를 합성하는 효소이다. 식물에서 CoQ_9의 합성은 미토콘드리아에서 일어나기 때문에(Takahashi et al. 2006, 2009, 2010), 미토콘드리아에서 DdsA의 발현은 이미 존재하는 CoQ_9 대사경로를 연장하여 CoQ_{10}을 생산하는 전략이다. Nipponbare 형질전환체는 대조군에 비하여 10배 정도 더 많은 양의 CoQ_{10}을 생산하였다. 이 연구팀은 또한 두 개의 거대 배 품종(giant embryo rice line)인 Haiibuki와 Chukei-toku 70에서 DdsA를 발현시켰을 때, Nipponbare-DdsA 형질전환체보다 CoQ_{10}의 양을 각각 1.4배, 1.8배 증대됨을 보고하였다. 또한 CoQ_{10}은 주로 벼 종자의 쌀겨와 배에 주로 존재하기 때문에, 가공되지 않은 현미를 먹는 것이 CoQ_{10}의 섭취에 바람직하다(Takahashi et al. 2006; 2010). 또한 카로테노이드와 토코페롤에서 연구되었듯이, flux의 양을 증대시키기 위하여 up-stream 유전자들이나 PPT의 과발현과 더불어 효율성이 좋은 decaprenyl diphosphate synthase의 발현은 식물에서 CoQ_{10}의 함량을 증진시킬 수 있을 것이다.

결 론

지용성 항산화 물질은 개발도상국 사람들에게는 중요한 필수 영양소를 공급할 뿐 아니라 선진국에서는 건강보조제로 사용됨으로써 고부가가치 시장을 창출할 수 있다. 따라서 지용성 항산화 물질을 식물에서 대사공학을 통한 합성 양을 증진하기 위하여, 식물에 내재된 대사 경로를 조절함으로써, 원하는 물질들이 종자 등 식용가능 조직에서 잘 생산되어 축적되는 것과 더불어 실제로 체내에서 흡수되는 한계 비율 이상의 생산증진 또한 염두에 두어야 한다. 식물에서 합성되는 항산화 물질의 대사공학은 합성되는 대사 경로의 특징에 따라서 다르게 접근해야 한다. 카로테노이드나 토코페롤처럼 단일 생합성 경로에 의해 합성되는 항산화 물질인 경우는, 생합성 경로에서 비가역적 효소 반응 단계 또는 주요 분기점의 조절이 주요 대상이다. 이는 초기 병목현상을 완화시키고 이후 단계에서 분해 대사를 줄임으로써 양적 또는 질적으로 합성물의 조성을 조절할 수 있다. 그러나 만약 항산화 물질이 여러 경로에 의존하여 만들어지는 경우에는 식물 내에서 항상성을 유지를 위한 복잡한 조절 기작이 있을 수 있다. 이런 경우는 형질전환한 유전자의 발현에 대한 피드백을 피하기 위하여 종자와 같은 어떤 국한된 조직에서 대사 경로를 조절하는 등 정교한 전략이 필요하다. 최근 세 종류의 비타민(A, C, K)과 카로테노이드의 양이 증가한 멀티비타민 옥수수가 선보임으로써 한층 더 항산화 기능이 증대된 작물을 얻을 수 있었다(Naqvi et al. 2009). 향후 연구는 한 곡물에서 비타민과 미네랄 등 여러 가지 기능성 물질들의 합성 경로를 유전공학적으로 동시에 조절하여 고부가가치를 지닌 식량 작물을 개발하는데 집중될 전망이다. 그러나 이를 성취하기 위해서는 대사 경로들간의 복잡한 상호작용을 염두에 두어야 하기 때문에 세포 내에서 이들 물질들에 대한 대사적 네트워크 모델의 구축과 엽록체와 핵 유전체의 형질 전환 기술 등에 대한 연구가 필요하다.

적 요

세포내에는 비효소적 반응으로 활성산소류를 제거하는 소분자의 항산화 물질과 과산소와 하이드로페록사이드를 분해하는 효소들이 존재한다. 항산화 시스템은 자유라디칼과 활성산소류를 제거함으로써 산화스트레스로부터 세포 구성요소들을 보호하는 역할을 한다. 비효소적 항산화 물질은 지용성과 친수성이 있는데, 지용성 물질들은 세포막에 위치하며 과산화지질이 형성되는 반응을 억제한다. 카로테노이드와 비타민E, CoQ_{10}은 세포 내에서 주요 지용성 항산화 물질로써, 이들이 대량으로 축적된 주요 작물의 개발은 영양학적 가치가 높은 식품을 생산할 수 있다. 본 총설에서는 식물에서 카로테노이드와 비타민E, CoQ_{10}의 생합성 경로와 대사공학을 이용한 영양강화 연구 현황을 기술하였다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 기관고유과제(과제번호 PJ008556)와 차세대 바이오그린21사업, 시스템합성농생명공학사업 단 과제(SSAC 과제번호 PJ0094842014)의 연구비 지원으로 수행 되었습니다.

References

Ajjawi I, Shintani D (2004) Engineered plants with elevated vitamin E: a nutraceutical success story. Trends biotechnol 22:104-107

Ahn M-J, Noh SA, Ha S-H, Back K, Lee SW, Bae JM (2012) Production of ketocarotenoids in transgenic carrot plants with an enhanced level of β-carotene. Plant Biotechnol Rep 6: 133-140Bashan N, Kovsan J, Kachko I, Ovadia H, Rudich A (2009) Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species. 89:27-71

Brigelius-Flohe R and Traber MG (1999) Vitamin E: function and metabolism. FASEB J 13:1145-1155

Burkhardt PK, Beyer P, Wünn J, Klöti A, Amstrong GA, Schledz M, Von Lintig J, Potrykus I (1997) Transgenic rice (*Oryza*

sativa) endosperm expressing daffodil (*Narcissus pseudonarcissus*) phytoene synthase accumulate phytoene, a key intermediate of provitamin A biosynthesis. Plant J 11:1071-1078

Burton GW (1990) Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. Annu Rev Nutr 10:357-382

Cahoon EB, Hall SE, Ripp KG, Ganzke TS, Hitz WD, Coughlan SJ (2003) Metabolic redesign of vitamin E biosynthesis in plants for tocotrienol production and increased antioxidant content. Nat Biotechnol 21:1082-1087

Capell T and Christou P (2004) Progress in plant metabolic engineering. Curr Opin Biotechnol 15:148-154

Chaudieáre J and Ferrari-Iliou R (1999) Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. Food Chem Toxicol 37:949-962

Chew BP, Park JS, Wong MW, Wong TS (1999) A comparison of the anticancer activities of dietary beta-carotene, canthaxanthin and astaxanthin in mice *in vivo*. Anticancer Res 19:1849-4853

Collakova E, DellaPenna D (2003) Homogentisate phytyltransferase activity is limiting for tocopherol biosynthesis in Arabidopsis. Plant Physiol 131:632-642

Dhanasekaran M and Ren J (2005) The emerging role of coenzyme Q_{10} in aging, neurodegeneration, cardiovascular disease, cancer and diabetes mellitus. Curr Neurovasc Res 2:447-459

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

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

Enfissi EMA, Fraser PD, Lois LM, Boronat A, Schurch W, Bramley PM (2005) Metabolic engineering of the mevalonate and non-mevalonate isopentenyl diphosphate-forming pathways for the production of health promoting isoprenoids in tomato. Plant Biotechnol J 3:17-27

Estévez JM, Cantero A, Reindl A, Reichler S, León P (2001) 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. J Biol Chem 276:22901-22909

Falk J, Andersen G, Kernebeck B, Krupinska K (2003) Constitutive overexpression of barley 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase in tobacco results in elevation of vitamin E content in seeds but not in leaves. FEBS Lett 540:35-40

FAO (2009) Maize, rice and wheat: area harvested production quantity yield. FAO, Rome

Fitzpatrick TB, Basset GJC, Borel P, Carrari F, DellaPenna D, Fraser PD, Hellmann H, Osorio S, Rothan C, Valpuesta V, Caris-Veyrat C, Fernie AR (2012) Vitamin deficiencies in humans: can plant science help? Plant Cell 24:395-414

Fraser PD and Bramley PM (2004) The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. Prog Lipds Res 43:228-265

Fraser PD, Romer S, Shipton CA, Mills PB, Kiano JW, Misawa N, Drake RG, Schuch W, Bramley PM (2002) Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner. Proc Natl Acad Sci USA 99:1092-1097

Fray RG, Wallace A, Fraser PD, Valero D, Hedden P, Bramley PM, Grierson D (1995) Constitutive expression of a fruit phytoene synthase gene in transgenic tomatoes causes dwarfism by redirecting metabolites from the gibberellins pathway. Plant J 8:693-701

Gülçin I (2012) Antioxidant activity of food constituents: an overview. Arch Toxicol 86:345-391

Huang J-C, Zhong Y-J, Liu J, Sandmann G, Chen F (2013) Metabolic engineering of tomato for high-yield production of astaxanthin. Metab Eng 17:59-67

Jeya M, Moon H-J, Lee J-L, Kim I-W, Lee J-K (2014) Current state of coenzyme Q_{10} production and its applications. App Microbiol Biotechnol 85:1653-1663

Kamei M, Fujita T, Kanbe T, Sasaki K, Oshiba K, Otani S, Matsui-Yuasa I, Morisawa S (1986) The distribution and content of ubiquinone in foods. Int J Vitam Nutr Res 56:57-63

Kawamukai M (2009) Biosynthesis and bioproduction of coenzyme Q10 by yeast and other organisms. Biotechnol Appl Biochem 53:217-226

Kawaoka A and Ebinuma H (2001) Transcriptional control of lignin biosynthesis by tobacco LIM protein. Phytochem 57:1149-1157

Lee JK, Her G, Kim SY, Seo JH (2004) Cloning and functional expression of the dps gene encoding decaprenyl diphosphate synthase from Agrobacterium tumefaciens. Biotechnol Prog 20:51-56

Li L and Van Eck J (2007) Metabolic engineering of carotenoid accumulation by creating a metabolic sink. Transgenic Res 16:581-585

Li Y, Wang G, Hou R, Zhou Y, Gong R, Sun X, Tang K (2011) Engineering tocopherol biosynthetic pathway in lettuce. Biol Plant 55:453-460

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, O'Halloran DM, Cosman KM, Conlin BJ, Paolillo DJ, Garvin DV, Vrebalov J, Kochian LV, Küpper H, Earle ED, Cao J, Li L (2006) The cauliflower Or gene encodes a DnaJ Cysteine-rich domain-containing protein that mediates high levels of beta-carotene accumulation. Plant Cell 18:3594-3605

Mann V, Harker M, Pecker I, Hirschber J (2000) Metabolic engineering of astaxanthin production in tobacco flowers. Nature Biotechnol 18:888-892

Mirmiran P, Golzarand M, Serra-Majem L, Azizi F (2012) Iron, Iodine and Vitamin A in the middle east; a systematic review of deficiency and food fortification. Iranian J Publ Health 41:8-19

Morris WL, Ducreus LJ, Fraser PD, Millam S, Taylor MA (2006) Engineering ketocarotenoid biosynthesis in potato tubers. Metab Eng 8:253-263

Naqvi S, Zhu C, Farré G, Ramessar K, Bassie L, Breitenbach J,

Conesa DP, Ros G, Sandmann G, Capell T and Christou P (2009) Transgenic multivitamin corn through biofortification of endosperm with three vitamins representing three distinct metabolic pathways. Proc Natl Acad Sci USA 106:7762-7767

Naqvi S, Farré G, Zhu C, Sandmann G, Capell T, Christou P (2011) Simultaneous expression of Arabidopsis p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase and MPBQ methyltransferase in transgenic corn kernels triples the tocopherol content. Transgenic Res 20:177-181

Ndikubwimana JD, Lee BH (2014) Enhanced production techniques, properties and uses of coenzyme Q10. Biotechnol Lett 36:1917-1926

Paine JA, Shipton CA, Chaggar S, Howells RM, Kennedy MJ, Vernon G, Wright SY, Hinchliffe E, Adams JL, Silverstone AL, Drake R (2005) Improving the nutritional value of golden rice through increased pro-vitamin A content. Nat Biotechnol 23:482-487

Römer S, Lubeck J, 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. Metab Eng4:263-272

Schaub P, Al-Babili S, Drake R, Beyer P (2005) Why is golden rice golden (yellow) instead of red? Plant Physiol 138:441-450

Shewmaker CK, Sheehy JA, Daley M, Colburn S, Ke DY (1999) Seed-specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects. Plant J 20:401-412

Shintani D, DellaPenna D (1998) Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering. Science 282:2098-2100

Takahashi S, Ogiyama Y, Kusano H, Shimada H, Kawamuka M, Kadowaki K (2006) Metabolic engineering of coenzyme Q by modification of isoprenoid side chain in plant. FEBS Lett 580:955-959

Takahashi S, Ohtani T, Iida S, Sunohara Y, Matsushita K, Maeda H, Tanetani Y, Kawai K, Kawamuka M, Kadowaki K (2009) Development of CoQ10-enriched rice from giant embryo lines. Breed Sci 59:321-326

Takahashi S, Ohtani T, Satoh H, Nakamura Y, Kawamukai M, Kadowaki K (2010) Development of CoQ10-enriched rice using sugary and shrunken mutants. Biosci Biotechnol Biochem 74:182-184

Tanaka T, Makita H, Ohnishi M, Mori H, Satoh K, Hara A (1995) Chemoprevention of oral carcinogenesis by naturally occurring xanthophylls, astaxanthin and canthaxanthin. Cancer Res 55:4059-4064

Tsegaye Y, Shintanin DK, DellaPenna D (2002) Overexpression of the enzyme p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase in Arabidopsis and its relationship to tocopherol biosynthesis. Plant Physiol Biochem 40:913-920

van den Briel T, Cheung E, Zewari J, Khan R (2007) Fortifying food in the field to boost nutrition: case studies from Afghanistan, Angola, and Zambia. Food Nutr Bull 28:353-64.

Van Eenennaam AL, Lincoln K, Durrett TP, Valentin HE, Shewmaker CK, Thorne GM, Jiang J, Baszis SR, Levering CK, Aasen ED, Hao M, Stein JC, Norris SR, Last RL (2003) Engineering vitamin E content: from Arabidopsis mutant to Soy oil. Plant Cell 15:3007-3019

Wirth JP, Laillou A, Rohner F, Northrop-Clewes CA, Macdonald B, Moench-Pfanner R (2012) Lessons learned from national food fortification projects: experiences from Morocco, Uzbekistan, and Vietnam. Food Nutr Bull 33:281-292.

Ye X, AI-Babili S, Klöti A, Zhang J, Lucca P, Beyer P, Potrykus I (2000) Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. Science 287:303-305

Yoshida H, Kotani Y, Ochiai K, Araki K (1998) Production of ubiquinone-10 using bacteria. J Gen Appl Microbiol 44:19-26

Yu B, Lydiate DJ, Young LW, Schäfer UA, Hannoufa A (2008) Enhancing the carotenoid content of Brassica napus seeds by downregulating lycopene epsilon cyclase. Transgenic Res 17:537-585

Yuan D, Bassie L, Sabalza M, Miralpeix B, Dashevskaya S, Farre G, Rivera SM, Banakar R, Bai C, Sanahuja G, Arjo´ G, Avilla E, Zorrilla-Lo´pez U, Ugidos-Damboriena N, Lo´pez, A, Almacellas D, Zhu C, Capell T, Hahne G, Twyman RM, Christou P (2011) The potential impact of plant biotechnology on the millennium development goals. Plant Cell Rep 30:249-265

Zhu C, Naqvi S, Breitenbach J, Sandmann G, Christou P, Capell T (2008) Combinational genetic transformation generates a library of metabolic phenotypes for the carotenoid pathway in corn. Proc Natl Acad Sci USA 105:18232-18237

Zhu C, Naqvi S, Capell T, Christou P (2009) Metabolic engineering of ketocarotenoid biosynthesis in higher plants. Arch Biochem Biophys 483:182-190

Zhu Changfu, Sanahuja G, Yuan D, Farré G, Arjó G, Berman J, Zorrilla-López U, Banakar R, Bai C, Pérez-Massot E, Bassie L, Capell T, Christou P (2013) Biofortification of plants with altered antioxidant content and composition: genetic engineering strategies. Plant Biotechnol J 11:129-141