

*Pichia pastoris*에서 강낭콩 Leghemoglobin α 의 생산, 정제 및 특징

김준영¹, 한다희¹, 박근오¹, 남수완^{1,2}, 김연희^{1,2}, 김한우^{3,4}, 전승중^{1,2,4*}

¹동의대학교 바이오응용공학부 의생명공학전공

²동의대학교 스마트바이오헬스학과

³극지연구소 생명과학연구본부

⁴과학기술연합대학원대학교 극지과학과

Received: November 2, 2022 / Accepted: November 21, 2022

Production, Purification, and Characterization of *Phaseolus vulgaris* Leghemoglobin α in *Pichia pastoris*

Jun-Young Kim¹, Da-Hee Han¹, Geun-o Park¹, Soo-Wan Nam^{1,2}, Yeon-Hee Kim^{1,2}, Han-Woo Kim^{3,4}, and Sung-Jong Jeon^{1,2,4*}

¹Biomedical Engineering and Biotechnology Major, Division of Applied Bioengineering, Dong-Eui University, Busan 47340, Republic of Korea

²Department of Smart-Biohealth, Dong-Eui University, Busan 47340, Republic of Korea

³Division of Life Sciences, Korea Polar Research Institute (KOPRI), Incheon 21990, Republic of Korea

⁴Department of Polar Sciences, University of Science and Technology(UST), Incheon 21990, Republic of Korea

In this study, *Phaseolus vulgaris* (kidney bean) leghemoglobin α (PhLba) gene was cloned into pPICZaA and expressed in *Pichia pastoris* to sustainably produce a heme-carrying protein for organoleptic use in plant-based meat. The recombinant PhLba protein was secreted into the culture medium in a solubilized form, and the molecular weight of the purified PhLba was estimated to be 16.5 kDa using SDS-PAGE. In addition, the yield of recombinant PhLba holoprotein was enhanced by supplementation of the cultivation medium with hemin. This result indicates that the apo-forms of PhLba can be effectively saturated with cofactor.

Keywords: Leghemoglobin, heme, cofactor, *Phaseolus vulgaris*, *Pichia pastoris*

Leghemoglobin은 콩과 식물의 뿌리 결절에서 발견되는 단백질로서 철(Fe^{2+})과 결합된 heme을 보조인자로 구성한다 [1, 2]. 이 단백질의 주요 생리 기능은 질소 고정에 필요한 높은 ATP 수요를 충족시키기 위해 세균 호흡에 산소를 제공함으로써 식물과 질소고정 세균 사이의 공생에 관여한다[2]. 이런 메커니즘은 동물의 말초 조직으로 산소를 운반하는 헤모글로빈(hemoglobin)의 기능과 유사하다.

최근 지구 온실 가스 배출량을 낮추려는 노력의 일환으로 동물성 고기를 대신할 식물 기반 대체육의 개발이 주목받고 있다. 이중에서 대두(soybean) leghemoglobin은 다진 쇠고기의 ‘피’를 모방한 붉은색 액체를 제공하는 기능을 수행

할 뿐만 아니라 식물성 대체육 제품에 고기와 같은 풍미를 부여할 수 있다[3]. 또한 leghemoglobin을 구성하는 heme은 맛의 역할 외에도 인간의 영양에 필수적이고, 인체에 있는 기능성 철의 약 95%와 선진국의 평균 철분 섭취량의 66%가 heme에서 유래한다[4]. 대표적인 콩과 식물인 루핀(lupin), 동부(cowpea), 대두(soybean) 유래의 leghemoglobin은 cDNA 서열을 바탕으로 대장균의 발현 시스템을 이용하여 생산하였지만 매우 적은 양의 재조합 단백질을 생성하거나 불입체 형태의 불용성 단백질을 생성하였다[5–7]. 최근 soybean 유래 leghemoglobin은 *Pichia pastoris*의 단백질 발현 시스템을 이용하여 생산하였고, Impossible Foods 사(Redwood City)의 식물성 고기 제품에 leghemoglobin의 지속적인 사용을 가능하게 하였다[3].

본 연구에서는 식물 기반 대체육에 사용할 수 있는 leghemoglobin을 생산할 목적으로 강낭콩(*Phaseolus vulgaris*)

*Corresponding author

Phone: +82-51-890-2278, Fax: +82-502-600-9289

E-mail: jeon.sj@deu.ac.kr

유래 leghemoglobin a (PhLba)에 주목하였다. PhLba는 강낭콩에서 추출 및 정제되어 trypsin으로 절단한 후 전체 145개의 아미노산 서열이 결정되었지만[8], 다른 숙주에서 유전자 발현을 통해 생산된 적은 없다. 본 연구에서 PhLba의 coding sequence (CDS)를 바탕으로 cDNA를 합성 및 cloning 하고, pPICZaA vector [9, 10]를 사용하여 *P. pastoris*의 염색체 속으로 삽입한 후 발현시켜 PhLba의 세포 외 분비 생산을 시도하였다. 또한 배양 배지에 hemin을 첨가하여 재조합 PhLba의 발현 및 분광학적 특성을 분석하였다.

PhLba의 cDNA를 확보하기 위하여 강낭콩 유래 leghemoglobin a gene (*PhLba*, Genbank No.: K03152)의 염기서열을 바탕으로 HT-oligo™ 합성기(Bioneer)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 PhLba cDNA는 pTOP TA V2 vector (Enzymomics)에 cloning 하였고, 2종류의 primer (LbaF: 5'-GGAATTCATGGGTGCTTTCCTGAGAA-3', LbaR: 5'-GCTCTAGACTAAGCATATGCCTTTTAAATAG-3') (Bioneer)를 사용하여 PCR로 증폭하였다. 이 때 LbaF 및 LbaR primer는 각각 제한효소 *Eco* RI 및 *Xba* I 서열을 포함하고 있으며, 증폭된 456 bp의 DNA는 *Eco* RI 및 *Xba* I로 절단한 후 pPICZaA vector (Invitrogen)의 *Eco* RI 및 *Xba* I 부위에 삽입하여 재조합 plasmid pPICZaA-PhLba를 제조하였다. 이때 PhLba 유전자는 signal sequence α -factor 유전자와 연결되어 발현된 단백질이 세포 외로 분비되도록 설계하였다. 제조된 plasmid pPICZaA-PhLba는 제한효소 *Sac* I로 절단하여 선형으로 만든 후 *P. pastoris* X-33의 염색체 속으로 electroporation법에 의해 삽입하였다[10]. 형질전환체의 염색체 상에 PhLba 유전자가 삽입되었는지 확인하기 위해서 2종류의 primer (AOX1(F): 5'-GACTGGTTCCAATTGACAAG-3', AOX1(TT(R): 5'-GCA AATGGCATTCTGACATC-3') (Bioneer)를 사용하여 PCR로 증폭하고 sequencing한 결과 PhLba cDNA의 염기서열과 일치하였고(자료 미제시), 이와 같이 구축된 재조합 균주를 X-Lba라고 명명하였다.

재조합 균주 X-Lba로부터 PhLba의 발현은 Jo 등[11]의 방법을 약간 변형하여 사용하였다. Buffered glycerol complex medium (BMGY) 배지에 접종한 종균을 30°C, 250 rpm에서 하룻밤 배양하고 원심분리하여 침전을 회수한 후, Buffered methanol complex medium (BMMY) 배지에 OD₆₀₀≐1.0이 되도록 첨가한 다음 본 배양을 시행하였다. PhLba의 발현을 유도하기 위해서 본 배양 시작 24시간 후부터 96시간까지 매 24시간 마다 methanol을 최종농도 0.3% (v/v)가 되게 첨가하였다. 매시간마다 배양액을 원심분리하고 상등액을 회수하여 SDS-PAGE로 분석한 결과, 재조합 PhLba는 세포 외로 분비되어 가용화 형태로 존재하였고, 1-4일 동안 배양 시

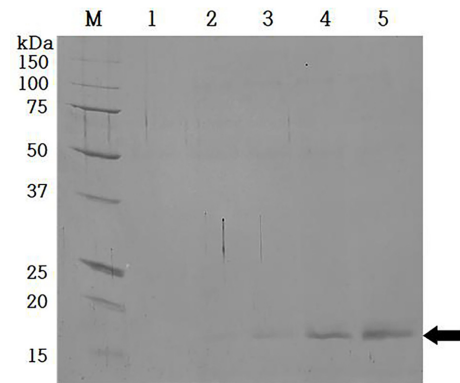


Fig. 1. The expression of recombinant PhLba in *P. pastoris*. Increase of recombinant PhLba in the extracellular proteins from *P. pastoris* was monitored by SDS-PAGE. M, protein size marker; lane 1, incubation for 0 h; lane 2, incubation for 24 h; lane 3, incubation for 48 h; lane 4, incubation for 72 h; lane 5, incubation for 96 h.

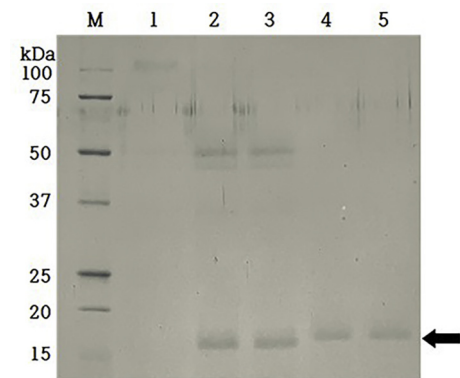


Fig. 2. SDS-PAGE analysis of the expression and purification of recombinant PhLba in medium supplementation with and without hemin. M, protein size marker; lane 1, negative control; lane 2, culture supernatant of *P. pastoris* in the presence of hemin; lane 3, culture supernatant of *P. pastoris* in the absence of hemin; lane 4, the purified recombinant PhLba from culture supernatant in the presence of hemin; lane 5, the purified recombinant PhLba from culture supernatant in the absence of hemin.

간이 경과함에 따라 단백질의 발현양이 증가하였다(Fig. 1). 재조합 PhLba의 분자량은 약 16.5 kDa을 나타내어 cDNA 유전자에서 예상되는 분자량인 15.6 kDa 보다는 조금 크게 나타나 당쇄의 부가에 기인한 것으로 추측된다(Fig. 1).

Leghemoglobin과 같이 heme을 cofactor로 포함하는 peroxidase는 곰팡이, 곤충, 효모 세포에서 유전자 발현을 통해 생산하였고, 배양 배지속에 hemin을 첨가함으로써 재조합 heme 단백질의 생산량을 증가시킬 수 있었다[12-14]. 재조합 PhLba을 발현 생산함에 있어 cofactor의 영향을 알아

보기 위하여 0.5 L의 BMMY 배지속에 10 μ M hemin을 첨가하고 methanol로 유도발현 시켰다. 배양액을 회수하여 SDS-PAGE로 단백질 band를 분석한 결과 hemin을 첨가한 배지와 미첨가한 배지에서 생산한 PhLba는 비슷한 발현양을 나타냈다(Fig. 2, lane 2 and 3). 또한, hemin을 첨가 및 미첨가한 배지의 배양 상등액 중의 단백질량을 측정된 결과, 각각 31 ± 3 및 29 ± 2 μ g/ml로 확인되어 오차 범위내에서 비슷한 양을 나타냈다. Hemin을 첨가 및 미첨가한 배지에서 생산한 PhLba를 정제하기 위하여 배양 상등액을 원심분리(5,000 \times g, 5 min)로 회수하고, 포화농도 80%로 ammonium sulfate를 첨가하여 4°C에서 2시간 방치한 후 원심분리(10,000 \times g, 20 min) 하였다. 원심분리 한 후 침전물은 buffer A (50 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.0)에 녹인 후 같은 buffer로 24시간 투석하였다. 투석한 용액은 ÄKTAprime plus (Cytiva)을 이용하여 Superdex™ 200 column (Cytiva)에 로딩한 후 buffer A로 용출하고 용출된 희분은 SDS-PAGE (15% acrylamide gel)에 loading한 후 coomassie brilliant blue 염색을 통하여 단일 밴드를 확인하였다(Fig. 2, lane 4 and 5).

정제한 재조합 PhLba의 제1철(Fe^{2+}) 및 제2철(Fe^{3+}) 유도체에 대한 성상을 알아보기 위하여 UV-visible 흡수 스펙트럼을 측정하였다. Hemin을 첨가한 배지에서 생산한 PhLba는 406, 532, 565, 624 nm에서 최대 흡수 파장을 보여 강낭콩에서 정제한 native leghemoglobin α 의 Fe^{3+} -H₂O 유도체에서 나타나는 흡수 파장(404.5, 490, 532, 565, 625 nm)과 거의 유사한 양상을 나타내었다(Fig. 3) [15]. 반면, hemin을 첨가하지 않은 배지에서 생산된 PhLba는 406, 532, 565,

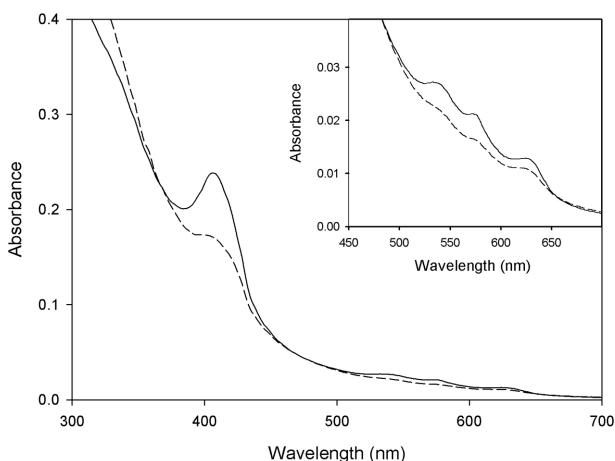


Fig. 3. Spectroscopic property of the purified PhLba in presence and absence of hemin. The expressed PhLbas (1.4 μ M) in the presence (—) and absence (---) of hemin were purified and analyzed for UV-visible absorption spectrum. Conditions: 50 mM sodium phosphate pH 7.0.

624 nm에서 흡광도가 훨씬 감소한 것으로 보아 PhLba의 상당수가 apoprotein의 형태로 배양액에 축적하는 것으로 생각된다(Fig. 3). 이것은 hemin을 배지에 첨가할 경우, 효모에서 생산 분비된 apoprotein이 배지속의 hemin에 의해 holoprotein을 형성한다는 것을 의미한다. 이와 같은 결과는 peroxidase를 곰팡이, 곤충, 효모 세포에서 발현할 때 배지에 hemin을 첨가할 경우 활성형 효소의 생산량이 각각 7, 1.6, 18배로 상승하여 holoprotein의 형성이 증가한다고 보고된 것과 일치한다[12–14]. 이와 같이 heme의 불충분한 혼입은 활성형 heme 단백질의 재조합 생산에 있어 중요한 장애 요인이 될 수 있고, 이를 해결하기 위해서는 배지속에 hemin을 첨가함으로써 holoprotein의 생성을 향상시킬 수 있다.

본 연구에서는 강낭콩 유래 leghemoglobin α 를 *P. pastoris* 세포 외에서 가용화 형태로 분비 생산하였고, 배양 배지속에 첨가한 hemin은 PhLba의 holoprotein 형성에 기여한다는 사실을 확인하였다. 향후 효모의 heme 생합성에 관여하는 효소 유전자를 대사공학적인 기법으로 개량함으로써 heme를 지속적으로 제공할 수 있는 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

식물성 육류에서 미각적인 자극을 얻기 위해 사용하는 heme 함유 단백질의 지속적인 생산을 위해 강낭콩 유래 leghemoglobin α (PhLba) 유전자를 pPICZ α A에 클로닝하고 *Pichia pastoris*에서 발현하였다. 재조합 PhLba 단백질은 가용화 형태로 배양 배지속으로 분비되었다. 정제된 PhLba의 분자량은 SDS-PAGE 상에서 16.5 kDa로 나타났다. 재조합 PhLba holoprotein의 수율은 배양 배지에 hemin을 첨가함으로써 향상되었다. 이것은 PhLba의 apo 형태가 보조인자와 함께 효과적으로 포화된다는 것을 나타낸다.

Acknowledgments

This work was supported by Dong-Eui University Grant (202201710001).

Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

- Appleby CA. 1984. Leghemoglobin and Rhizobium respiration. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **35**: 443-478.

2. Hardison R. 1998. Hemoglobins from bacteria to man: evolution of different patterns of gene expression. *J. Exp. Biol.* **201**: 1099-1117.
3. Fraser RZ, Shitut M, Agrawal P, Mendes O, Klapholz S. 2018. Safety evaluation of soy leghemoglobin protein preparation derived from *pichia pastoris*, intended for use as a flavor catalyst in plant-based meat. *Int. J. Toxicol.* **37**: 241-62.
4. Hooda J, Shah, A, Zhang L. 2014. Heme, an essential nutrient from dietary proteins, critically impacts diverse physiological and pathological processes. *Nutrients* **3**: 1080-1102.
5. Sikorski MM, Topunov AF, Strozycki PM, Vorgias CE, Wilson KS, Legocki AB. 1995. Cloning and expression of plant leghemoglobin cDNA of *Lupinus luteus* in *Escherichia coli* and purification of the recombinant protein. *Plant Sci.* **108**: 109-117.
6. Arrendondo-Peter R, Moran JF, Sarath G, Luan P, Klucas RV. 1997. Molecular cloning of the cowpea leghemoglobin II gene and expression of its cDNA in *Escherichia coli*. *Plant Physiol.* **114**: 493-500.
7. Prytulla S, Dyson HJ, Wright PE. 1996. Gene synthesis, high-level expression and assignment of backbone 15N and 13C resonances of soybean leghemoglobin. *FEBS Lett.* **399**: 283-289.
8. Lehtovaara P, Ellfolk N. 1975. The amino-acid sequence of leghemoglobin component a from *Phaseolus vulgaris* (kidney bean). *Eur. J. Biochem.* **54**: 577-584.
9. Sreekrishna K, Brankamp RG, Kropp KE, Blankenship DT, Tsay JT, Smith PL, et al. 1997. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* **190**: 55-62.
10. Sue MP, Mariana LF, Brian M, Linda MH. 2005. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* **22**: 249-270.
11. Jo JH, Im EM, Kim SH, Lee HH. 2011. Surface display of human lactoferrin using a glycosylphosphatidylinositol anchored protein of *Saccharomyces cerevisiae* in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Lett.* **33**: 1113-1120.
12. Conesa A, van den Hondel CAMJJ, Punt PJ. 2000. Studies on the production of fungal peroxidases in *Aspergillus niger*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3016-3023.
13. Segura MD, Levin G, Miranda MV, Mendive FM, Targovnik HM, Cascone O. 2005. High-level expression and purification of recombinant horseradish peroxidase isozyme C in SF-9 insect cell culture. *Process Biochem.* **40**: 795-800.
14. Krainer FW, Capone S, Jäger M, Vogl T, Gerstmann M, Glieder A, et al. 2015. Optimizing cofactor availability for the production of recombinant heme peroxidase in *Pichia pastoris*. *Microb. Cell Fact.* **14**: 4.
15. Lehtovaara P. 1977. Studies on ligand binding of kidney bean leghemoglobin. *Acta. Chem. Scand.* **B31**: 21-27.