

## К ВОПРОСУ ПОЛУЧЕНИЯ СЛАДКОГО БЕЛКА – БРАЗЗЕЙНА

**А.П. Михеева, Н.С. Евдокимов, Т.А.Савельева**

Научный руководитель – **Н.С. Евдокимов**, к.т.н., доцент

**ФГАОУ ВО «Омский государственный технический университет»**

За последние 15 лет отмечается значительный рост количества публикаций в научно-технической литературе, посвященных получению браззеина. В связи с этим, интерес представляет обзор данных о возможностях производства браззеина различными биотехнологическими способами.

Браззеин – термостабильный белок, который приблизительно в 2 тысячи раз слаще сахара. Он был выделен в двух формах из плодов западноафриканского растения *Pentadiplandra brazzeana* Baillon [1]. Основная форма содержит пироглутамат на своем N-конце, в то время как второстепенная форма не имеет этого N-концевого пироглутамата. Основная форма имеет сладость в 500 раз больше сахарозы при весовом подсчёте и в 9500 раз выше в пересчете на молекулу [2]. Второстепенная форма имеет вдвое большую сладость, чем основная форма. Браззеин как белок термоустойчив при температуре 80°C и времени обработки в течение 4 часов [3]. Браззеин состоит из 54 аминокислотных остатков, это самый маленький из сладких белков, его молекулярная масса составляет 6,5 кДа. Трёхмерный анализ браззеина выявил одну альфа-спираль и три антипараллельных бета-складки. При этом, его структура не похожа ни на один из двух других сладких на вкус белков - монеллина и тауматина [4].

Браззеин является сахарозаменителем для людей, страдающих гипергликемией. Безопасность натурального браззеина подтверждается употреблением в пищу приматами и туземцами-аборигенами Западной Африки плодов растения *Pentadiplandra brazzeana* Baillon. Как было показано Barry Lynch (2023 г.) браззеин не является генотоксичным и не оказывает побочных

эффектов после 90-дневного перорального диетического потребления крысами. Браззеин не вызывает аллергии и безопасен по результатам токсикологических исследований *in vitro* и *in vivo* [5].

Поскольку браззеин трудно экстрагировать из натуральных источников, то были созданы несколько систем для его получения биотехнологическим способом. Микроорганизмами-продуцентами для этой цели являются *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*, *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*), *Kluyveromyces lactis*.

Так, рекомбинантные формы браззеина, полученные с помощью метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris* в течение 6 дней продуцировали до 90 мг/л браззеина в пересчете на очищенную форму. Они активировали человеческий рецептор сладкого *in vitro* и вызывали сладость *in vivo* со свойствами, сходными со свойствами двух природных форм браззеина [5]. О получении браззеина с помощью *Pichia pastoris* сообщал также Poirier N [6].

S.W. Park (2021 г.) [7] сообщает об оптимизации питательных сред для получения секреторного рекомбинантного браззеина с помощью *Kluyveromyces lactis* GG799 и выработках белка в биореакторах (Ecell, Anyang, Корея) объемом 10 л с последующей ультрафильтрационной очисткой. Рекомбинантный браззеин экспрессировался в растворимой форме и был функционально активен. Конечное содержание целевого белка 107 мг/л. Идентичность полученного белка была подтверждена аминокислотным анализом. Тестирование на вкус показало, что браззеин имел присущую сладость, примерно в 2 тысячи раз слаще сахарозы в пересчете на массу. Исследователи считают, что система экспрессии *K. lactis* может быть применима для масштабного производства рекомбинантного браззеина для применения в пищевой промышленности [8].

По данным S.W. Park и соавторов (2021 г.) [7] микробные системы получения браззеина характеризуются низким уровнем экспрессии и нуждаются в комплексной системе очистки целевого вещества, в связи с чем их считают непригодными для массового производства. Тем не менее, известно, что в России браззеин был выработан на производственных ферментерах от стадии ферментации до сушки.

Существует еще один способ получения сладких белков (а именно -браззеина), при помощи трансгенных мышей, модифицированных для выработки сладких белков в их молоке. Для получения нового вида мышей ученые собирали бластоцисты из яйцеводов самок обычных мышей и культивировали в капле оптимизированной среды с калием, покрытой тестируемым на эмбрионах минеральным маслом. Затем в культивированные бластоцисты вводили от 10 до 15 клеток mES - белков, регулирующих часть спектра изменений гистонов, обнаруживаемых на X-хромосомах в зародышевых клетках с помощью пьезоманипуляций, а реконструированные эмбрионы переносили в матку ложнобеременных матерей. Химерных мышей скрещивали с мышами дикого типа для получения потомства и закрепления свойств. Продуцируемый в процессе лактации такими трансгенными мышами браззеин (в составе молока) имел сладкий вкус. В перспективе это исследование может лечь в основу производства подслащенного браззеином молока от сельскохозяйственных животных, таких как коровы и козы [9-10].

#### *Заключение*

На сегодняшний день способ производства рекомбинантного браззеина хорошо отработан на пилотном оборудовании. Каждый из способов – как с помощью микроорганизмов, так и с помощью трансгенных животных – имеет присущие им достоинства и недостатки. Так микроорганизмы имеют в достаточно высокую скорость выработки браззеина в чистом виде, однако способ с использованием химерных мышей, вероятно, будет более удобным с экономической и технологической точки зрения, поскольку вырабатываться будет не чистый браззеин, а уже смешанный с молоком. Это исключает ряд затратных операций по очистке белка и дает большие возможности при производстве различных молочных продуктов.

#### **Список использованных источников**

1. Fariba M. Assadi-Porter a, Sammy Patry , John L. Markley (2008) Protein Expression and Purification// Efficient and rapid protein expression and purification of small high disulfide containing sweet protein brazzein in *E. coli*. №58 P. 263-268. doi: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1046592807002781>

2. Nobuyuki Ide, Tetsuya Masuda, Naofumi Kitabatake (2007) Biochemical and Biophysical Research Communications// Effects of pre- and pro-sequence of thaumatin on the secretion by *Pichia pastoris*. №363 P. 708-714. doi: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006291X07019900>
3. Ding Ming, Göran Hellekant (1994) *Febbs Letters*//Brazzein, a new high-potency thermostable sweet protein from *Pentadiplandra brazzeana* B. №355 P. 106-108. doi: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1016/0014-5793%2894%2901184-2>
4. Браззеин [Электронный ресурс] // [agrohimija.ru](http://agrohimija.ru): Информационный некоммерческий ресурс, 2022. URL: <https://agrohimija.ru/stati/4880-brazzein.html>
5. Barry Lynch, Jason Ryde, Tina Wang, Trung Vo, Shahrzad Tafazoli Safety evaluation of oubli fruit sweet protein (brazzein) derived from *Komagataella phaffii*, intended for use as a sweetener in food and beverages // *Toxicology Research and Application* 2023. – V.7. doi.org/10.1177/2397847323115125
6. Poirier N, Roudnitzky N, Brockhof A, Belloir C, Maison M, Thomas-Danguin T, Meyerhof W, Briand L (2012) Efficient production and characterization of the sweet-tasting brazzein secreted by the yeast *Pichia pastoris*. *J Agric Food Chem* 60:9807–9814
7. Park, SW., Kang, BH., Lee, HM. *Et al.* Efficient brazzein production in yeast (*Kluyveromyces lactis*) using a chemically defined medium. *Bioprocess Biosyst Eng* 44, 913–925 (2021). <https://doi.org/10.1007/s00449-020-02499-y>
8. Jo HJ, Noh JS, Kong KH (2013) Efficient secretory expression of the sweet-tasting protein brazzein in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Protein Expr Purif* 90:84–89
9. Yan S, Song H, Pang D, Zou Q, Li L, Yan Q, Fan N, Zhao X, Yu H, Li Z, Wang H, Gao F, Ouyang H, Lai L (2013) Expression of plant sweet protein brazzein in the milk of transgenic mice. *PLoS One* 8(10):e76769. doi: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0076769>
10. Rui Lu, Xiaoming Li, Yancui Wang, Le Jin (2021) Food and Bioproducts Processing//Expression of functional plant sweet protein thaumatin II in the milk of transgenic mice. №125 P. 222-227. doi: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960308520305587>