

ISSN 1561-8323 (Print)
ISSN 2524-2431 (Online)

УДК 579.66:577.217.3+579.842.11+613.29
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2020-64-1-71-77>

Поступило в редакцию 25.07.2019
Received 25.07.2019

И. С. Казловский¹, И. В. Бельская², член-корреспондент А. И. Зинченко¹

¹Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

²Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии,
Минск, Республика Беларусь

БИОСИНТЕЗ БРАЗЗЕИНА В БАКТЕРИАЛЬНОЙ СИСТЕМЕ БЕСКЛЕТОЧНОГО СИНТЕЗА БЕЛКА

Аннотация. В настоящем исследовании в качестве варианта, альтернативного каноническому глубинному культивированию в ферментере, была изучена возможность синтеза сладкого растительного белка браззеина в бактериальной системе бесклеточного синтеза белка (БСБ). Для синтеза этого фермента использовали S30-клеточный экстракт *Escherichia coli*, химерную РНК-полимеразу бактериофага Т7 и высококопийный плазмидный вектор pET42mut со встроенным в него геном браззеина. В результате выполнения работы впервые продемонстрирована возможность синтеза сладкого белка в системе БСБ. При этом объемный выход браззеина в оптимизированных условиях проведения процесса составил 2 мг/мл реакционной смеси, что в 57 раз больше, чем максимальный выход его в ранее описанных в литературе экспериментах с использованием цельноклеточных систем экспрессии.

Ключевые слова: браззеин, сахарозаменитель, *Escherichia coli*, бесклеточный синтез белка, высококопийная pET42mut-плазида

Для цитирования: Казловский, И. С. Биосинтез браззеина в бактериальной системе бесклеточного синтеза белка / И. С. Казловский, И. В. Бельская, А. И. Зинченко // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2020. – Т. 64, № 1. – С. 71–77. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2020-64-1-71-77>

Ilia S. Kazlouski¹, Ina V. Belskaya², Corresponding Member Anatoly I. Zinchenko¹

¹Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

²Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Republic of Belarus

BIOSYNTHESIS OF BRAZZEIN USING THE BACTERIAL CELL-FREE PROTEIN SYNTHESIS SYSTEM

Abstract. Feasibility of producing brazzein plant sweetener by the cell-free biosynthesis procedure as an alternative to the classical submerged fermentation method was assessed in the present investigation. Chimeric RNA polymerase of T7 bacteriophage, S30-cell extract of *Escherichia coli* and multicopy plasmid vector pET42mut with the inserted brazzein gene were included into the protein synthesis. The completed research resulted in the first successful demonstration of the sweet protein biosynthesis in the cell-free system. The volumetric brazzein yield under optimized process conditions was 2 mg/ml of the reaction mixture, exceeding 57 times the maximum values that had been achieved in the previous studies applying whole-cell expression systems.

Keywords: brazzein, sugar substitute, *Escherichia coli*, cell-free protein synthesis system, multicopy pET42mut plasmid

For citation: Kazlouski I. S., Belskaya I. V., Zinchenko A. I. Biosynthesis of brazzein using the bacterial cell-free protein synthesis system. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2020, vol. 64, no. 1, pp. 71–77 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2020-64-1-71-77>

Введение. Сахарозаменители – химические соединения, применяющиеся вместо сахарозы и придающие пищевым продуктам сладкий вкус. Как правило, они имеют меньшую калорийность по сравнению с сахарозой, придавая пище необходимый сладкий вкус той же интенсивности.

Согласно классификации Международной ассоциации производителей подсластителей и низкокалорийных продуктов (Calorie Control Council), к группе сахарозаменителей относят ксилит, сорбит и фруктозу (левулезу). Эти сахарозаменители полностью усваиваются организмом человека и безопасны, но, к сожалению, высококалорийны. В отдельную группу так называемых подсластителей пищи входят сахарин, цикламат, сукралоза, неогесперидин, глицирризин, стевиозид и лактулоза. В отличие от сахарозаменителей, эти соединения не усваиваются организмом и не имеют энергетической ценности [1; 2].

Глобальное распространение в последнее время ожирения и сахарного диабета привело к повышению интереса к безопасным и низкокалорийным натуральным подсластителям с благоприятными вкусовыми свойствами. В связи с этим большое внимание уделяется белкам с интенсивным сладким вкусом. К настоящему времени обнаружено шесть природных белков, которые в состоянии вызвать интенсивную сладость у людей: тауматин, монеллин, мабинлин, браззеин, пентадин и неокулин [3]. Эти белки встречаются в растениях, произрастающих в тропических лесах Южной Азии и Африки. Среди перечисленных белков самым сладким и стабильным является браззеин. В концентрации 40 г/л он слаще сахарозы в 1900 раз [4]. Кроме того, этот белок отличается наиболее удовлетворительным послевкусием [5], что делает его весьма перспективным коммерческим продуктом.

Впервые браззеин был изолирован из плодов растения *Pentadiplandra brazzeana* [5], в которых он содержится в количестве 0,05–0,2 % по массе. Браззеин является одноцепочечным белком с молекулярной массой 6,49 кДа и хорошо растворим в воде (около 50 г/л) [6]. Присутствие в молекуле браззеина четырех дисульфидных мостиков обуславливает его стабильность в диапазоне pH от 2,5 до 8 и температуры. Так, сообщалось [6], что браззеин остается сладким после инкубации в течение 2 ч при 98 °С.

По сравнению с применяемыми высокоинтенсивными подсластителями, у браззеина имеются явные преимущества, и только высокие затраты на его производство пока не позволяют этому белку составить достойную конкуренцию на мировом рынке привычным сахарозаменителям [7].

Цель исследования – изучение возможности получения рекомбинантного браззеина при помощи бактериальной системы бесклеточного синтеза белка (БСБ). Система БСБ [8] предусматривает создание реакционной смеси из лизата, полученного из клеток различных живых организмов, рекомбинантной плазмидной ДНК, содержащей ген, кодирующий необходимый целевой белок, РНК-полимеразы (для транскрипции гена) и премикса – раствора, который содержит четыре канонических нуклеозидтрифосфата (субстраты для РНК-полимеразы), АТФ как источник энергии, аминокислоты и буферную систему для поддержания необходимого pH среды. Инкубацию полученной смеси проводят до достижения максимального выхода целевого продукта.

Материалы и методы исследования. Основой для создания генетической конструкции, кодирующей браззеин, служила сконструированная нами ранее высококопийная плазида рЕТ42mut [9], содержащая ген *kanR*, обуславливающий устойчивость к антибиотику канамицину, сильный промотор бактериофага T7, а также полилинкер с множественными сайтами клонирования.

Ген браззеина был химически синтезирован в ОДО «Праймтех» (Беларусь), основываясь на уже известной аминокислотной последовательности белка. К 3'- и 5'-концам гена (для удобства в дальнейшей генно-инженерной работе) были добавлены нуклеотидные последовательности, узнаваемые рестриктазами *NdeI* и *XhoI* соответственно. Полученный ген очищали при помощи препаративного 1 %-ного агарозного гель-электрофореза.

Рестрикцию гена и вектора рЕТ42mut осуществляли ферментами *NdeI* и *XhoI* по методикам, рекомендованным производителем (ThermoFisher, США).

Лигирование целевого гена и вектора проводили T4-лигазой (ThermoFisher, США). Полученной лигазной смесью трансформировали компетентные клетки штамма *Escherichia coli* XLBlue методом электропорации.

Рестрикционный и ПЦР-анализ полученных клонов осуществляли по стандартным методикам. Результаты визуализировали с помощью электрофореза и обрабатывали с использованием системы гель-документирования и программного обеспечения фирмы BioRad. Секвенирование клонов проводили при помощи автоматизированной системы генетического анализа Beckman Coulter GenomeLab GeXP™ (BeckmanCoulter, США) с использованием коммерческого набора, поставляемого вместе с оборудованием, на базе ГУ «РНПЦ эпидемиологии и микробиологии».

Из полученных трансформантов при помощи щелочного лизиса выделяли плазмиды, которые в дальнейшем использовали для трансформации электрокомпетентных клеток *E. coli* BL21 (DE3).

Клетки-трансформанты выращивали в LB-среде с добавлением канамицина с конечной концентрацией 80 мкг/мл. Клетки, содержащие целевые плазмиды, культивировали в жидкой среде LB с последующим выделением плазмидной ДНК методом щелочного лизиса.

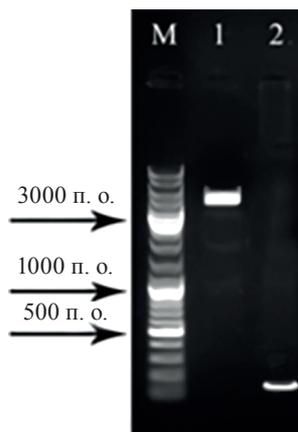


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов рестрикции вектора pET42a(+) (1) и гена браззеина (2). М – маркер молекулярных масс фрагментов ДНК (здесь и далее)

Fig. 1. Electrophoregram of restriction products derived from vector pET42a(+) (1) and brazzein gene (2). М – molecular weight marker of DNA fragments (hereinafter)

Для синтеза браззеина реакционную смесь (1,0 мл), содержащую 0,25 мл 30S-экстракта, полученного из лизата клеток *E. coli* BL21 (DE3), 0,65 мл премикса, 5000 ед. активности SSo7d-T7-РНК-полимеразы, полученной нами ранее методом, описанным в [10], и 500 нг плазмидной ДНК инкубировали при 30 °С в течение 7 ч. За приростом количества целевого продукта в реакционной смеси следили с помощью метода определения белка по Петерсону [11].

По окончании синтеза реакцию разбавляли 50%-ным Na-фосфатным буфером (рН 8,0), содержащим 300 мМ NaCl и 20 мМ имидазола, и наносили на хроматографическую колонку со смолой Ni-NTA (Qiagen, США). Белок элюировали 50 мМ Na-фосфатным буфером (рН 8,0), содержащим 300 мМ NaCl и 500 мМ имидазола. Полученные в результате аффинной хроматографии образцы анализировали с помощью ДСН-полиакриламидного гель-электрофореза. Фракции, содержащие целевой белок, объединяли и диализовали против стерильной воды.

Результаты и их обсуждение. На первом этапе работы ген браззеина длиной 164 п. о. выделили из коммерческой неэкспрессионной плазмидной ДНК с помощью эндонуклеаз *NdeI* и *XhoI* (рис. 1). Затем провели лигирование полученного гена и вектора, который предварительно был линеаризован по сайтам рестрикции *NdeI* и *XhoI*.

Полученной лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli* XLBlue, и ДНК трансформантов подвергли ПЦР-анализу для подтверждения наличия в ней целевого гена в правильной ориентации. Для этого использовали праймеры, комплементарные к нуклеотидной последовательности, кодирующей Т7-промотор, и гену браззеина.

При помощи щелочного лизиса из выбранного штамма-трансформанта выделили плазмиду и подвергли рестрикционному анализу по сайту узнавания рестриктазы *HindIII*. Последующий электрофоретический анализ в агарозном геле показал, что полученная линейная молекула ДНК имеет теоретически рассчитанный размер – 5182 п. о. Результаты секвенирования этой плазмиды показали, что в ее составе нуклеотидная последовательность вставки совпадает с известной последовательностью нуклеотидов, кодирующих браззеин. Полученную генетическую конструкцию далее использовали для синтеза браззеина в системе БСБ.

На следующем этапе работы осуществили оценку эффективности синтеза браззеина в зависимости от температуры и концентрации SSo7d-T7-РНК-полимеразы в реакционной смеси изучаемой нами системы БСБ. Конечная концентрация компонентов реакции составляла: 100 мМ НЕРЕС-КОН (рН 8,0), 8 мМ Mg(CH₃COO)₂, 90 мМ KCH₃COO, 20 мМ фосфоенолпируват калия, набор аминокислот (каждая в концентрации 1,3 мМ), 0,15 мг/мл фолиевой кислоты, четыре природных рибонуклеозидтрифосфатов (каждый в концентрации 1 мМ), 0,05 % NaN₃, 2 % полиэтиленгликоль 8000, 0,04 мг/мл пируваткиназы, 0,5 мг/мл плазмидной ДНК, содержащей ген браззеина, 0,5 мг/мл суммарной тРНК (из *E. coli* MRE 600) и экстракт S30, полученный из лизата

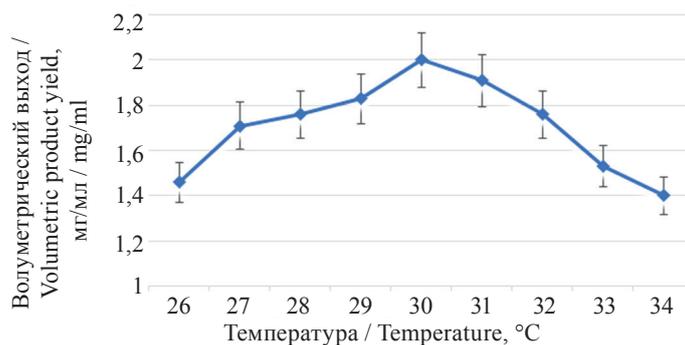


Рис. 2. Зависимость объемного выхода реакции синтеза браззеина от температуры инкубирования

Fig. 2. Relationship between volumetric yield of brazzein synthesis reaction and incubation temperature

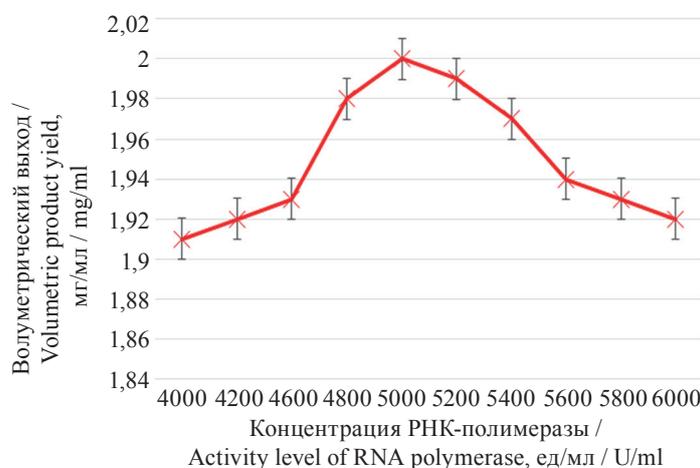


Рис. 3. Зависимость объемного выхода реакции синтеза браззеина от концентрации SSo7d-T7-РНК-полимеразы

Fig. 3. Relationship of volumetric brazzein yield with enzymatic activity level of supplied SSo7d-T7-RNA polymerase

клеток *E. coli* (30 % от общего объема реакционной смеси). Инкубацию проводили в течение 7 ч в диапазоне температур от 26 до 34 °C с умеренным перемешиванием. На рис. 2 показана зависимость выхода браззеина в мг/мл реакционной смеси (объемный выход) от температуры проведения реакции.

Из полученного графика можно сделать вывод, что максимальный выход целевого продукта достигается при инкубировании реакционной смеси при температуре 30 °C. Эта температура использовалась в дальнейших экспериментах.

Зависимость эффективности синтеза браззеина от концентрации вносимой в реакционную смесь РНК-полимеразы представлена на рис. 3. Из него следует, что оптимальная концентрация фермента составляет 5000 ед. активности в 1 мл реакционной смеси.

На заключительном этапе работы была поставлена реакция бесклеточного синтеза браззеина в объеме 1 мл и проведено его выделение из реакционной смеси. Чистота полученного белкового препарата, оцененная с помощью электрофореза в полиакриламидном геле и программного обеспечения ImageLab (BioRad, США), составила более 98 % (рис. 4). Молекулярная масса полученного белка (оцененная электрофоретически) составила около 7,5 кДа. Поскольку теоретически рассчитанная молекулярная масса (исходя из известного аминокислотного состава браззеина) равняется 7,856 кДа, можно заключить, что полученный нами белок соответствует браззеину.

Выход браззеина в эксперименте, описанном выше, достиг 2 мг/мл реакционной смеси при проведении реакции в течение 7 ч. В плане обсуждения следует отметить, что при проведенных ранее синтезах рекомбинантного браззеина в цельноклеточной системе экспрессии максимальный выход составлял 0,030–0,035 мг/мл культуральной жидкости. При этом процесс занимал 10–12 ч [12].

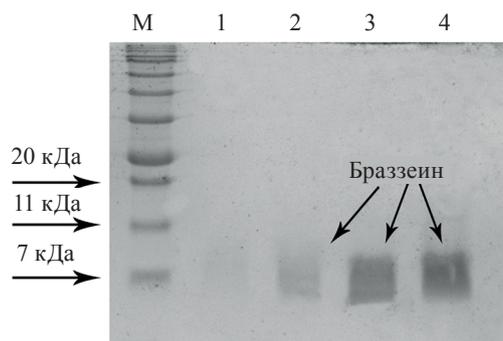


Рис. 4. Электрофореграмма фракций браззеина после элюции с колонки со смолой Ni-NTA

Fig. 4. Electrophoregram of brazzein fractions eluted from the column with Ni-NTA resin

Полученный нами в настоящей работе результат был достигнут благодаря тому, что при синтезе браззеина мы использовали сконструированную нами ранее высококопийную плазмиду рЕТ42mut [9] и высокоэффективную химерную SSo7d-T7-РНК-полимеразу РНК [13].

Закключение. Для применения в пищевой промышленности сахарозаменители и подсластители должны иметь те же технофункциональные свойства, что и привычный сахар, но предпочтительно без его калорийной нагрузки. До настоящего времени не обнаружены ни синтетические, ни природные сладкие вещества, способные полностью имитировать органолептический профиль сахарозы. Их главными недостатками часто являются побочный привкус (горечь, металлический привкус и т. д.) и несхароподобный временной профиль (позднее начало сладости и/или не привычно длящаяся сладость).

Среди известных к настоящему времени сахарозаменителей наиболее близким по органолептическим параметрам к привычному сахару является белок, найденный в мякоти плодов, произрастающих на африканском дереве *Pentadiplandra brazzeana* [5]. Его безопасность доказана многовековым употреблением в пищу приматами и туземцами-аборигенами, проживающими в районах произрастания этого вида деревьев.

К сожалению, содержание браззеина в плодах *P. brazzeana* составляет величину порядка 0,2 % [5], что делает выделение его из этого природного источника экономически нецелесообразным.

По мнению ряда исследователей [7; 12], проблему доступности браззеина можно решить с помощью современной генно-инженерной техники. В настоящем исследовании мы впервые продемонстрировали возможность использования для синтеза рекомбинантного браззеина системы БСБ. При этом объемный выход браззеина в оптимизированных условиях проведения процесса составил 2 мг/мл реакционной смеси, что значительно превышает выход этого белка, достигнутый в экспериментах с использованием цельноклеточных систем экспрессии [12].

По нашему мнению, синтез браззеина с использованием бактериальной системы БСБ расширяет ассортимент способов получения этого перспективного сахарозаменителя и может выступать в качестве варианта, альтернативного каноническому глубинному культивированию рекомбинантного штамма-производителя в ферментере.

Следует подчеркнуть, что получение браззеина с использованием системы БСБ в литературе не описано, и предложенное решение не является очевидным, поскольку не всегда экспрессия генов в гетерологической системе происходит успешно [14].

Список использованных источников

1. Егорова, И. А. О пользе и вреде сахарозаменителей / И. А. Егорова, С. Г. Комарова // Усп. в хим. и хим. техн. – 2015. – Т. 29, № 2. – С. 51–53.
2. Жаббарова, С. К. Влияние сахарозаменителей и подсластителей на безвредность кондитерских изделий / С. К. Жаббарова // Universum: Технические науки. – 2019. – № 2 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://7universum.com/ru/tech/archive/item/6953>. – Дата доступа: 25.07.2019.

3. Faus, I. Recent developments in the characterization and biotechnological production of sweet-tasting proteins / I. Faus // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2000. – Vol. 53, N 2. – P. 145–151. <https://doi.org/10.1007/s002530050001>
4. Hellekant, G. Primate sense of taste: behavioral and single chorda tympani and glossopharyngeal nerve fiber recordings in the rhesus monkey, *Macaca mulatta* / G. Hellekant, V. Danilova, Y. Ninomiya // *J. Neurophysiol.* – 1997. – Vol. 77, N 2. – P. 978–993. <https://doi.org/10.1152/jn.1997.77.2.978>
5. Ming, D. Brazzein, a new high-potency thermostable sweet protein from *Pentadiplandra brazzeana* / D. Ming, G. Hellekant // *FEBS Lett.* – 1994. – Vol. 355, N 1. – P. 106–108. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)01184-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)01184-2)
6. Efficient production and characterization of the sweet-tasting brazzein secreted by the yeast *Pichia pastoris* / N. Poirier [et al.] // *J. Agric. Food. Chem.* – 2012. – Vol. 60, N 39. – P. 9807–9814. <https://doi.org/10.1021/jf301600m>
7. The recent development of a sweet-tasting brazzein and its potential industrial applications / F. Neiers [et al.] // *Reference Series in Phytochemistry.* – Springer Int. Publ., 2016. – P. 1–20. https://doi.org/10.1007/978-3-319-26478-3_2-1
8. Creating cell-free protein synthesis factories / C. Heide [et al.] // *Pharm. Bioprocess.* – 2018. – Vol. 6, N 1. – P. 3–6.
9. Казловский, И. С. Модификация экспрессионной pET-системы для использования в бесклеточном синтезе белка / И. С. Казловский, А. Н. Рымко, А. И. Зинченко // *Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты.* – Минск, 2018. – Т. 10. – С. 69–78.
10. Казловский, И. С. Создание штамма-продуцента химерного белка, состоящего из РНК-полимеразы и ДНК-аффинного домена / И. С. Казловский, А. И. Зинченко // *Докл. Нац. акад. наук Беларуси.* – 2018. – Т. 62, № 5. – С. 601–607. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2018-62-5-601-607>
11. Peterson, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable / G. L. Peterson // *Anal. Biochem.* – 1977. – Vol. 83, N 2. – P. 346–356. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(77\)90043-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(77)90043-4)
12. Expression of the sweet-tasting plant protein brazzein in *Escherichia coli* and *Lactococcus lactis*: a path toward sweet lactic acid bacteria / A. Berlec [et al.] // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2006. – Vol. 73, N 1. – P. 158–165. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0438-y>
13. A novel strategy to engineer DNA polymerases for enhanced processivity and improved performance *in vitro* / Y. Wang [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2004. – Vol. 32, N 3. – P. 1197–1207.
14. Baneyx, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli* / F. Baneyx // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 1999. – Vol. 10, N 5. – P. 411–421. [https://doi.org/10.1016/s0958-1669\(99\)00003-8](https://doi.org/10.1016/s0958-1669(99)00003-8)

References

1. Egorova I. A., Komarova S. G. About the benefits and dangers of sugar substitutes. *Uspekhi v khimii i khimicheskoi tekhnologii = Advances in Chemistry and Chemical Technology*, 2015, vol. 29, no. 2, pp. 51–53 (in Russian).
2. Jabbarova S. K. Influence of sugar-substitute and sweeteners on the safety of confectioners products. *Universum: Technicheskie nauki = Universum: Technical Science*, 2019, no. 2. Available at: <http://7universum.com/ru/tech/archive/item/6953> (accessed 25 July 2019).
3. Faus I. Recent developments in the characterization and biotechnological production of sweet-tasting proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2000, vol. 53, no. 2, pp. 145–151. <https://doi.org/10.1007/s002530050001>
4. Hellekant G., Danilova V., Ninomiya Y. Primate sense of taste: behavioral and single chorda tympani and glossopharyngeal nerve fiber recordings in the rhesus monkey, *Macaca mulatta*. *Journal of Neurophysiology*, 1997, vol. 77, no. 2, pp. 978–993. <https://doi.org/10.1152/jn.1997.77.2.978>
5. Ming D., Hellekant G. Brazzein, a new high-potency thermostable sweet protein from *Pentadiplandra brazzeana*. *FEBS Letters*, 1994, vol. 355, no. 1, pp. 106–108. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)01184-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)01184-2)
6. Poirier N., Roudnitzky N., Brockhoff A., Belloir C., Maison M., Thomas-Danguin T., Meyerhof W., Briand L. Efficient production and characterization of the sweet-tasting brazzein secreted by the yeast *Pichia pastoris*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, vol. 60, no. 39, pp. 9807–9814. <https://doi.org/10.1021/jf301600m>
7. Neiers F., Naumer C., Krohn M., Briand L. The recent development of a sweet-tasting brazzein and its potential industrial applications. *Reference Series in Phytochemistry*. Springer International Publishing, 2016, pp. 1–20. https://doi.org/10.1007/978-3-319-26478-3_2-1
8. Heide C., Ces O., Polizzi K. M., Kontoravdi C. Creating cell-free protein synthesis factories. *Pharmaceutical Bioprocessing*, 2018, vol. 6, no. 1, pp. 3–6.
9. Kazlovskiy I. S., Rymko A. N., Zinchenko A. I. Modification of expression system of pET for using in cell-free protein synthesis. *Mikrobnye biotekhnologii: fundamental'nye i prikladnye aspekty* [Microbial biotechnologies: basic and applied aspects]. Minsk, 2018, vol. 10, pp. 69–78 (in Russian).
10. Kazlovskiy I. S., Zinchenko A. I. Construction of a strain-producer of the chimeric protein consisting of RNA polymerase and a DNA-affinity domain. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2018, vol. 62, no. 5, pp. 601–607 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2018-62-5-601-607>
11. Peterson G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, 1977, vol. 83, no. 2, pp. 346–356. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(77\)90043-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(77)90043-4)
12. Berlec A., Jevnikar Z., Majhenic A. C., Rogelj I., Strukelj B. Expression of the sweet-tasting plant protein brazzein in *Escherichia coli* and *Lactococcus lactis*: a path toward sweet lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, vol. 73, no. 1, pp. 158–165. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0438-y>

13. Wang Y., Prosen D. E., Mei L., Sullivan J. C., Finney M., Vander-Horn P. B. A novel strategy to engineer DNA polymerases for enhanced processivity and improved performance *in vitro*. *Nucleic Acids Research*, 2004, vol. 32, no. 3, pp. 1197–1207. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh271>

14. Baneux F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 1999. vol. 10, no. 5, pp. 411–421. [https://doi.org/10.1016/s0958-1669\(99\)00003-8](https://doi.org/10.1016/s0958-1669(99)00003-8)

Информация об авторах

Казловский Илья Сергеевич – магистр биол. наук, науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: kazlouski.illia@gmail.com.

Бельская Инна Валерьевна – магистр биол. наук, мл. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, Минск, Республика Беларусь). E-mail: v.inna.belskaya@gmail.com.

Зинченко Анатолий Иванович – член-корреспондент, д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: zinch@mbio.bas-net.by.

Information about the authors

Kazlouski Illia S. – Master of Biology, Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kazlouski.illia@gmail.com.

Belskaya Ina V. – Master of Biology, Junior researcher. Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: v.inna.belskaya@gmail.com.

Zinchenko Anatoliy I. – Corresponding Member, D. Sc. (Biology), Professor, Head of the Laboratory. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: zinch@mbio.bas-net.by.