

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102012902040205A1

Publication Date

20131010

Applicant

FOOD RESEARCH AND INNOVATION - F.R.I. S.R.L.

Title

METODO DI PREPARAZIONE E PURIFICAZIONE DI UNA PROTEINA
VEGETALE IMPIEGABILE COME DOLCIFICANTE.

Descrizione del brevetto per invenzione industriale dal titolo:

Metodo di preparazione e purificazione di una proteina vegetale impiegabile come dolcificante

Campo dell'invenzione

L'invenzione è relativa ad un metodo di preparazione della brazzeina non glicosilata mediante espressione in *Pichia pastoris*. Il *codon usage* della sequenza genomica codificante per la proteina brazzeina è stato ottimizzato in funzione del sistema di espressione.

Stato della tecnica

Il consumo di saccarosio attraverso la dieta è implicato più o meno direttamente nell'insorgenza di diverse patologie quali ad esempio obesità, carie dentali, malattie cardiovascolari, ipertensione, alcuni tipi di cancro e diabete mellito. Ad oggi, all'incirca 300 milioni di persone nel mondo soffrono di diabete ed i primi dieci paesi in cui si riscontra il numero più alto di casi di diabete sono: India, Cina, USA, Indonesia, Giappone, Pakistan, Russia, Brasile, Italia e Bangladesh. L'epidemia globale di obesità e sovrappeso assieme alle altre conseguenze dovute all'elevato consumo di zuccheri, sta rapidamente diventando uno dei principali problemi di salute pubblica. In questo contesto, la domanda di nuovi ingredienti dolcificanti, possibilmente di origine naturale, è molto elevata.

Nella ricerca di composti "dolcificanti" in sostituzione degli zuccheri, particolare interesse sembra avere la brazzeina. Si tratta di una proteina isolata per la prima volta dal frutto della pianta Africana *Pentadiplandra brazzeana* Bailon nel 1994 (Ming D. *et al.*, 1994). Tra le sei proteine "dolci" sinora identificate, la brazzeina sembra essere la più promettente. Rispetto alle altre proteine di questa classe, è caratterizzata da alte resistenze al calore e al pH, nella sua forma nativa non è glicosilata e, riferendosi ai dati riportati in letteratura, possiede un potere dolcificante 500-2000 volte superiore al saccarosio in termini di SE (Equivalenti di Saccarosio) (Berlec A. *et al.*, 2006).

Le limitazioni connesse con l'impiego della brazzeina in campo alimentare sono correlate all'ottenimento della pianta e le complicazioni associate alla produzione e coltivazione in larga scala sono le principali ragioni che rendono la produzione di

brazzeina da pianta economicamente non sostenibile. Una soluzione alternativa e più economica per la produzione industriale di tale proteina è offerta dalla tecnologia del DNA ricombinante.

Pichia pastoris rappresenta un sistema di espressione esemplare per la produzione di proteine per tre ragioni fondamentali: i) può essere facilmente manipolato a livello genetico; ii) è in grado di esprimere alti livelli di proteine ricombinanti; iii) apporta modifiche post-trascrizionali sulla sequenza proteica (glicosilazioni, formazione di ponti disolfuro, processamento proteolitico, ecc.) in modo simile a quanto si osserva in organismi cellulari eucariotici superiori.

Infatti, *Pichia pastoris* è un microorganismo da lungo tempo e comunemente impiegato per la produzione di proteine eterologhe sia per ricerca che per applicazioni industriali (Cregg J.M. *et al.*, 1993; Cereghino J.L. and Cregg J.M., 2000).

Miles L. *et al.* (Miles L. *et al.* 2010) descrivono un metodo di preparazione della brazzeina per espressione della stessa in lieviti ed in particolare in *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris*. La proteina, o parte di essa, prodotta secondo il metodo descritto nel brevetto sopracitato, viene però modificata dal sistema di espressione con l'aggiunta di glicosilazioni.

E' noto che lieviti quali *Pichia pastoris* e *Saccharomyces cerevisiae* possono modificare la proteina aggiungendo oligosaccaridi che differiscono da quelli osservati nei mammiferi per composizione e pattern di distribuzione delle unità saccaridiche. Tali modificazioni possono indurre reazioni allergiche nell'uomo poiché:

- la proteina con un diverso pattern di glicosilazione può essere riconosciuta dal sistema immunitario come sostanza *non-self*;
- catene oligosaccaridiche di maggiori dimensioni o glicosilazioni in siti diversi da quelli della proteina nativa possono impedire l'accesso ai siti di taglio sulla sequenza peptidica da parte delle proteasi del tratto digestivo, come ad esempio la pepsina.

L'aggiunta di glicosilazioni non native può inoltre mascherare siti catalitici o domini di interazione della proteina, causandone la perdita parziale o totale di attività biologica e di conseguenza limitarne l'efficacia nel prodotto finale. Questo è il

caso, ad esempio, della proteina ad attività *Antifreeze* ISP Type III HPLC 12, impiegata nella formulazione di gelati e prodotta per via ricombinante con l'impiego di *Saccharomyces cerevisiae*. Al termine del processo di fermentazione del lievito, si ottiene un prodotto contenente la proteina in forma attiva ed una miscela di isoforme glicoconjugate inattive (EFSA, 2008). Per quanto riguarda i possibili siti di glicosilazione, è noto che *Pichia pastoris* è in grado di aggiungere oligosaccaridi a residui di Asparagina all'interno di sequenze Asn-X-Thr/Ser, dove X è un qualsiasi aminoacido ad esclusione della Prolina. Un altro sito *consensus* di glicosilazione in lievito è stato identificato nella sequenza Asn-X-Cys (Knauer *et al.*, 1999); tale sito è presente nella sequenza amminoacidica della brazzeina. La glicosilazione dei residui di Serina e Treonina è invece più imprevedibile in quanto non esistono dati circa la specificità e la frequenza con cui questo tipo di modificazione avviene. Non è generalmente possibile prevedere se e come una data proteina verrà glicosilata da *Pichia*, sulla base del fatto che essa venga glicosilata o meno nell'organismo di provenienza (Cregg J.M. *et al.*, 2000).

Attualmente, le strategie che si possono adottare per impedire che *Pichia* apporti glicosilazioni non desiderate alla proteina sono:

- sostituzione delle Asparagine nei potenziali siti bersaglio di glicosilazione. Possibili complicazioni possono insorgere qualora il residuo di Asparagina sia critico per mantenere la struttura/funzione della proteina.
- espressione "intracellulare" o "citosolica" della proteina. In questo modo si evita alla proteina il passaggio per i compartimenti del Reticolo Endoplasmatico e Golgi, nei quali sono contenuti gli enzimi responsabili del processo di glicosilazione, pur perdendo i vantaggi in termini di semplicità del processo di purificazione che si otterrebbero sfruttando la via di secrezione.

L'espressione citosolica è inoltre un'alternativa difficilmente percorribile nel caso in cui la proteina necessiti di altre modificazioni post-traduzionali, quali ad esempio la formazione di ponti disolfuro.

È ancora attuale, quindi, l'esigenza di disporre di un metodo di preparazione della brazzeina mediante tecnologie di espressione applicabili a livello industriale, in cui

la proteina sia espressa in forma non glicosilata e con una opportuna configurazione strutturale.

È quindi uno scopo della presente invenzione l'ottenimento della proteina brazzeina in forma non glicosilata in un sistema di espressione in cellule applicabile all'industria alimentare.

Sommario

Ora gli inventori hanno trovato che la proteina brazzeina non glicosilata può essere ottenuta per espressione, inducibile o costitutiva, in un specifico ceppo di *P. pastoris*: il ceppo X33.

Tale ceppo di *P. pastoris* viene trasformato mediante inserzione nel suo genoma di una cassetta di espressione comprendente un promotore operativamente legato ad una sequenza nucleotidica codificante la brazzeina ed un terminatore ed opzionalmente una sequenza segnale per la secrezione della proteina espressa.

È quindi oggetto della presente invenzione un metodo di preparazione della proteina brazzeina comprendente almeno i passaggi di:

- trasformare una o più cellule di *Pichia pastoris*, con un vettore di espressione comprendente un promotore, una sequenza nucleotidica codificante per una sequenza di brazzeina ed un terminatore ed opzionalmente una sequenza segnale di secrezione;
- crescere la cellula o le cellule così trasformate in un mezzo di fermentazione in condizioni aerobiche,

caratterizzato dal fatto che:

la cellula o le cellule di *Pichia pastoris* sono del ceppo X33 e la brazzeina prodotta da tali cellule trasformate è la proteina non glicosilata.

Per l'espressione della brazzeina in *Pichia pastoris* si possono utilizzare diversi promotori, compreso il promotore della formaldeide deidrogenasi (FLD1), il promotore dell'isocitrato liasi (ILC1), il promotore del fattore di elongazione della trascrizione 1 (TEF1), il promotore della fosfoglicerato chinasi 1 (PGK1), il promotore della proteina di biogenesi del perossisoma (PEX8), e altri promotori conosciuti.

Per gli scopi della presente invenzione i promotori preferiti sono il promotore dell'alcol ossidasi 1 (pAOX1; SEQ ID NO: 8) per l'espressione inducibile della

brazzeina ed il promotore della gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (pGAP; SEQ ID NO: 12) per la sua espressione costitutiva, mentre la sequenza nucleotidica della brazzeina è una delle sequenze note della proteina nativa (SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6) o una forma modificata per il primo amminoacido (SEQ ID NO: 4), ottimizzate per il sistema di espressione.

La sequenza terminatore può essere scelta tra il terminatore dell'alcol ossidasi 1 (AOX1) ed il terminatore della gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAP). Preferibilmente il terminatore è AOX1 (SEQ ID NO: 10).

Inoltre, preferibilmente il vettore comprende anche un segnale di secrezione: il segnale di secrezione preferito è l' α -*mating factor* di *S. cerevisiae* (α -MF; SEQ ID NO: 9), ma possono essere usati anche altri segnali di secrezione noti ed impiegabili nei lieviti come ad esempio la sequenza segnale della Fosfatasi acida di *Pichia pastoris* (PHO1) o dell'Invertasi di *Saccharomyces cerevisiae* (SUC2). Pertanto, in una realizzazione preferita il genoma del ceppo X33 di *Pichia pastoris* comprende stabilmente un vettore comprendente una sequenza promotore scelta tra il promotore pAOX1 o pGAP, un segnale di secrezione consistente nel fattore α del *Saccharomyces cerevisiae*, una sequenza nucleotidica codificante per una sequenza della brazzeina, preferibilmente ottimizzata per il sistema di espressione, il terminatore AOX1 ed un marker di selezione per l'antibiotico ZeocinaTM (SEQ ID NO: 11).

Almeno una e preferibilmente due copie del costrutto genico che comprende la sequenza promotore pAOX1 o pGAP, la sequenza segnale di secrezione, la sequenza con il *reading frame* della proteina brazzeina e la sequenza terminatore AOX1 vengono integrate nel genoma del ceppo X33 di *Pichia pastoris*.

In un aspetto preferito le sequenze geniche per l'espressione della brazzeina sono scelte tra le sequenze di DNA di SEQ ID NO: 1, 2 e 3.

La proteina espressa viene quindi purificata dal mezzo di fermentazione dei lieviti, secondo un metodo che comprende i passaggi di: a) separazione delle cellule dal surnatante tramite filtrazione o centrifugazione; b) diluizione del surnatante ottenuto allo step a) e regolazione del pH; c) cromatografia a scambio ionico; d) concentrazione e diafiltrazione della proteina eluita dallo step c) per ridurre il contenuto di sali; e) liofilizzazione della proteina isolata.

Alla fine del processo descritto, la proteina ottenuta può essere utilizzata come sostituto al comune zucchero per uso alimentare in cibi e bevande, per impartire agli stessi un gusto percepito come dolce. Tra le diverse possibili applicazioni che si prospettano, una possibile è l'aggiunta di brazzeina in prodotti da forno, poiché la quantità di zucchero aggiunto per raggiungere la necessaria dolcezza spesso ostacola la capacità dell'impasto di lievitare.

Vista inoltre la resistenza al pH, la brazzeina potrebbe anche essere usata per impartire dolcezza a bevande a base acida, come succhi di frutta e bevande frizzanti. Un'altra possibile applicazione potrebbe essere quella di impiegare la proteina come eccipiente per prodotti farmaceutici in alternativa ad altri dolcificanti in uso nel settore.

Breve descrizione delle figure

Figura 1. La figura mostra la mappa del vettore del plasmide pPICZ α per l'espressione inducibile di brazzeina in *Pichia pastoris* con il promotore pAOX1.

Figura 2. La figura mostra la mappa del vettore del plasmide pGAP α utilizzato per l'espressione costitutiva di brazzeina in *Pichia pastoris* con il promotore pGAP.

Figura 3. La figura mostra il diagramma schematico del processo di ottenimento del vettore del plasmide con il promotore pGAP dal vettore pPICZ α A.

Figura 4. La figura mostra: il *Flow through* in uscita dalla colonna a scambio cationico (Sephacrose CM), dopo il caricamento del campione e lavaggio (A). Il profilo di eluizione delle proteine legate alla resina Sepharose CM, in seguito ad applicazione di un gradiente crescente di NaCl (B). Il profilo cromatografico della Frazione III caricata su una colonna RP (C). L'elettroforesi in *Polyacrilamide precast* gel a gradiente (4-20%). Linea 1: Pesi molecolari; Linea 2: Mezzo di fermentazione ottenuto dopo 72h ore di coltura, diluito 4.6x e portato a pH 4; Linea 3: Frazione I (Proteine non legate); Linea 4: Frazione II; Linea 5: Frazione III (brazzeina) (D).

Figura 5: La figura mostra: Spettri TOCSY di un campione 6.6 mg/ml di brazzeina a pH 3.5 riportati in "Studies on solution NMR structure of brazzein" (Gao et al. 1999, Science in China) (A). Spettro TOCSY di un campione 3.3 mg/ml di brazzeina a pH 3.5 (B). Spettro TOCSY di un campione 3.3 mg/ml di brazzeina a pH 3.5 dopo trattamento a 98°C per 2h (C).

Figura 6. La figura mostra l'elettroforesi in gel di Tris Tricina di un campione di brazzeina digerito con Pepsina. Linea 1) pepsina 1.28 mg/ml; Linea 2) Surnatante raccolto dal mezzo di coltura diluito ad una concentrazione finale di brazzeina 0.5 mg/ml; Linea 3) Ultra Low Molecular Weights; Linea 4) Pepsina 1.28 mg/ml incubata con 0.5 mg/ml di brazzeina in NaCl 30 mM, pH 1.5 37 °C a 1 minuto; Linea 5) 5 minuti; Linea 6) 10 minuti, Linea 7) 20 minuti, Linea 8) 40 minuti, Linea 9) 80 minuti.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

Con la seguente invenzione si descrive un nuovo, semplice, affidabile e conveniente metodo per la produzione di brazzeina non glicosilata usando il lievito *Pichia pastoris* e il suo processo di purificazione. *P. pastoris* è un lievito metilotrofico, recentemente riassegnata al genere *Komagataella*, che può essere ingegnerizzato geneticamente per esprimere proteine sia a scopi di ricerca che per utilizzo industriale.

Inoltre, *P. pastoris* può essere considerato come fonte sicura di ingredienti alimentari in quanto: (a) L'*American Type Culture Collection* (ATCC) classifica *Pichia* ad un livello 1 di biosicurezza, ossia come microorganismo che non provoca malattie in individui sani; (b) è conforme ai criteri OECD (*Organization for Economic Co-operation and Development*) per le *Good Industrial Large Scale Practices*; (c) è stato usato per la produzione di molte proteine anche ad utilizzo farmaceutico e (d) viene utilizzato nel foraggiamento di animali.

Esistono procedure standard per la manipolazione genetica, simili a quelle descritte per *S. cerevisiae*, in *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed., Sambrook, Joseph; Russel, David W., New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

Il metodo di preparazione della brazzeina oggetto della presente invenzione si fonda sull'impiego di un ben definito ceppo di *Pichia pastoris* che sorprendentemente e contrariamente a quanto noto per questi microorganismi ha dimostrato di esprimere la proteina nella forma non glicosilata.

Per tale metodo quindi possono essere impiegati tutti i promotori noti per l'espressione di proteine e/o polipeptidi in lieviti e le sequenze geniche note della brazzeina e sue varianti ottimizzate per l'espressione in lieviti.

Qui di seguito viene descritto in dettaglio il metodo di preparazione della brazzeina non glicosilata nelle sue realizzazioni preferite che prevedono l'impiego del vettore per l'espressione inducibile pPICZ α o il vettore per l'espressione costitutiva pGAP α .

Definizioni

La brazzeina è una proteina isolata dal frutto della pianta africana *Pentadiplandra brazzeana* Bailon la cui sequenza nota è costituita da 54 aa ed avente numero di accesso in banca dati P56552 (UniProtKB: locus DEF_PENBA).

Per gli scopi della presente invenzione le sequenze di brazzeina preferite impiegate per l'espressione inducibile o costitutiva in *P. pastoris*, ceppo X33 sono:

(SEQ ID NO: 4) (aa 54)

MDKCKKVYEN YPVSKCQLAN QCNYDCKLDK HARSGECFYD EKRNLQCICD YCEY;

(SEQ ID NO: 5) (aa 54)

QDKCKKVYEN YPVSKCQLAN QCNYDCKLDK HARSGECFYD EKRNLQCICD YCEY;

(SEQ ID NO: 6) (aa 53)

DKCKKVYEN YPVSKCQLAN QCNYDCKLDK HARSGECFYD EKRNLQCICD YCEY.

Le sequenze ID NO: 5 e 6 corrispondono rispettivamente alle forme di Brazzeina *wild type* tipo 2 e 3, la sequenza ID NO: 4 presenta una metionina all'estremità N-terminale per l'espressione opzionale in *E. coli*.

Queste sequenze proteiche sono codificate dalle sequenze nucleotidiche seguenti:

SEQ ID NO: 1 (165 nt)

ATGGATAAAT	GCAAGAAAAGT	ATATGAGAAT	TACCCAGTTA	GCAAGTGTCA	ATTGGCAAAC	60
CAGTGCAACT	ATGACTGTAA	ACTAGACAAG	CATGCTAGAA	GTGGAGAATG	TTTTTATGAT	120
GAAAAAAGGA	ATTTACAATG	CATATGCGAT	TATTGTGAGT	ATTAA		165

SEQ ID NO: 2 (165 nt)

CAGGATAAAT	GCAAGAAAAGT	ATATGAGAAT	TACCCAGTTA	GCAAGTGTCA	ATTGGCAAAC	60
CAGTGCAACT	ATGACTGTAA	ACTAGACAAG	CATGCTAGAA	GTGGAGAATG	TTTTTATGAT	120
GAAAAAAGGA	ATTTACAATG	CATATGCGAT	TATTGTGAGT	ATTAA		165

SEQ ID NO: 3 (162 nt)

GATAAATGCA	AGAAAAGTATA	TGAGAATTAC	CCAGTTAGCA	AGTGTCAATT	GGCAAACCAG	60
TGCAACTATG	ACTGTAAACT	AGACAAGCAT	GCTAGAAGTG	GAGAATGTTT	TTATGATGAA	120
AAAAGGAATT	TACAATGCAT	ATGCGATTAT	TGTGAGTATT	AA		162.

Tali sequenze sono da preferirsi in quanto senza alterare la sequenza amminoacidica della proteina presentano un *codon usage* ottimizzato per l'espressione in *P. pastoris*.

Per l'espressione inducibile della brazzeina viene usato per una realizzazione preferita del metodo oggetto dell'invenzione il vettore pPICZαA contenente il promotore AOX1 attivato in presenza di metanolo di SEQ ID NO: 8.

Per l'espressione costitutiva della brazzeina viene usato per un'altra realizzazione preferita del metodo oggetto dell'invenzione il vettore pGAPαA ricavato dalla sostituzione della sequenza del promotore AOX1 (SEQ ID NO: 8) con la sequenza del promotore pGAP (SEQ ID NO: 12).

La sequenza di secrezione della proteina preferita è l'*α-mating factor* di *S. cerevisiae*. avente la SEQ ID NO: 9.

La sequenza terminatore preferita è AOX1 Di SEQ ID NO: 10.

Il ceppo X33 presenta genotipo *wild-type* (non presenta nessuna auxotrofia) e fenotipo Mut⁺; tale fenotipo (Methanol utilization plus) si riferisce all'abilità del ceppo di crescere più velocemente utilizzando Metanolo come fonte di carbonio, rispetto ai ceppi Mut^s e Mut⁻.

Descrizione

Entrambi i vettori per la produzione inducibile pPICZα o costitutiva pGAPα della proteina comprendono una sequenza promotore, un segnale di secrezione, una sequenza che codifica per la brazzeina, un terminatore e un marker di selezione per l'antibiotico Zeocina™.

Costruzione dei vettori di espressione

Il plasmide comprendente il promotore pAOX1 (pPICZαA) per l'espressione inducibile della proteina ed un marker dominante di selezione che conferisce resistenza all'antibiotico Zeocina™, sia in *P. pastoris* sia in *Escherichia coli*, può essere commerciale e può essere ad esempio quello venduto da Invitrogen di catalogo No (V195-20).

Il cDNA della proteina è stato ottenuto per sintesi chimica (Sigma genosys) basandoci su una sequenza amminoacidica nota o nuova e preferibilmente scelta tra le sequenze SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6. Nel caso della SEQ ID NO: 1, cDNA preferito è ottenuto sostituendo la tripletta nucleotidica di

trascrizione della glutammina all'N-terminale della SEQ ID NO: 2 con una tripletta nucleotidica di trascrizione per una metionina per l'espressione opzionale in *E. coli*, ed ottimizzando il *codon usage* della sequenza per l'espressione in *Pichia pastoris* e *E.coli*.

Il *codon usage* è uno dei più importanti fattori che influenzano l'espressione di geni eterologhi; in generale, più codoni rari sono contenuti in una sequenza, più difficile sarà ottenere soddisfacenti livelli di espressione della proteina. Di conseguenza, l'ottimizzazione dei codoni senza alterare la sequenza amminoacidica della proteina codificata, può incrementare notevolmente i livelli di espressione di proteina. Per il metodo secondo l'invenzione l'ottimizzazione del codon usage è relativa a *Pichia pastoris* ed *E. coli*.

Inoltre, sono da eliminare tutti i possibili siti di restrizione dal cDNA che codifica per la brazzeina, in modo da rendere possibili successivi eventuali passaggi di manipolazione del gene come lo scambio tra diversi vettori o la rimozione di proteine di fusione e *tags*.

La sequenza cDNA scelta tra la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2 e la SEQ ID NO: 3 è quindi clonata nel sito di restrizione XhoI/NotI di pPICZαA per generare il vettore pPICZαA-bra (FIG. 1).

Il plasmide di espressione contenente il pGAP (FIG. 2) è invece ottenibile modificando il vettore pPICZαA-bra; il promotore pGAP è amplificato tramite PCR dal genoma di *Pichia pastoris* (cromosoma 4) e successivamente inserito nel plasmide pPICZαA-bra al posto del pAOX1 per generare il nuovo plasmide pGAPZαA-bra (FIG.3).

La produzione costitutiva di brazzeina è da preferire per applicazioni industriali poiché elimina il pericolo e i costi legati all'impiego di metanolo (stoccaggio e trasporto) Nell'ambito dell'utilizzo proposto per la proteina in questione, cioè il consumo umano, la rimozione del metanolo dal processo di produzione è una scelta obbligata, poiché esso è tossico per l'uomo.

Quest'ultimo sistema di espressione è preferibile anche poiché non richiede un'accurata ottimizzazione delle condizioni di coltura come nel caso dell'induzione con metanolo. Inoltre, a differenza dei plasmidi per l'espressione inducibile, i vettori che utilizzano il promotore GAP consentono di produrre in maniera

semplice la proteina ricombinante in continuo, rendendo tale sistema più adatto per la produzione su larga scala.

Pertanto, il plasmide pGAPZ α A-bra è da preferirsi per scopi applicativi industriali.

Entrambi i plasmidi comprendono anche il segnale di secrezione α -mating factor di *Saccharomyces cerevisiae* dopo il promotore, semplificando così il recupero della proteina eterologa secreta. Infatti, il vantaggio più grande di esprimere una proteina eterologa come proteina secreta è che *P. pastoris* secerne livelli molto bassi di proteine native. Altri segnali di secrezione possono essere utilizzati al posto dell' α -mating factor di *Saccharomyces cerevisiae* come già menzionato.

Entrambi i plasmidi per l'espressione inducibile e costitutiva sono trasformati nel ceppo di *E. coli* DH5 α al fine di amplificare il DNA per la successiva trasformazione dei lieviti.

I plasmidi pPIC α A-bra e pGAPZ α A-bra sono identificati mediante sequenziamento del DNA e utilizzati per l'espressione del gene della brazzeina in *P. pastoris*.

Trasformazione di *Pichia pastoris* con i vettori pPICZ α A-bra o pGAPZ α A-bra

Dopo la linearizzazione con un adeguato enzima di restrizione, il plasmide è usato per trasformare *P. pastoris* ceppo X33 mediante elettroporazione. Altri metodi possono essere utilizzati per trasformare i lieviti, quali ad esempio metodi chimici.

I cloni trasformati che presentano un elevato livello di espressione sono selezionati su piastre con concentrazioni crescenti di Zeocina™: i cloni in grado di crescere sulle piastre con concentrazioni più alte di Zeocina™ sono putativamente quelli contenenti più copie del gene della brazzeina.

I cloni selezionati possono essere conservati a -80 °C in un terreno contenente il 15% di glicerolo.

Selezione dei cloni più produttivi tramite esperimenti in beute

Le singole colonie selezionate sono analizzate per il loro livello di espressione proteica al fine di individuare il più efficienti. Le colture sono incubate a 30 °C per 3 giorni agitando a 230 rpm; per l'espressione inducibile il metanolo è aggiunto ogni 24 ore per mantenere l'induzione. Il surnatante della coltura è ottenuto ogni 24 ore attraverso centrifugazione ed è utilizzato per analizzare l'espressione proteica mediante Tris-Tricina SDS-PAGE elettroforesi.

Espressione della brazzeina in bioreattore

La fermentazione è eseguita in un bioreattore a 30 °C, DO (concentrazione di ossigeno disciolta; essa è la percentuale di ossigeno disciolto nel mezzo dove il 100% rappresenta il terreno saturato di O₂, pari a circa 220 µM) 20% (mantenuta attraverso il controllo dell'agitazione e dell'afflusso di aria) e pH 5.0. Le cellule di *Pichia pastoris* sono mantenute in una coltura *fed-batch* per 4 giorni. Per la purificazione della proteina il terreno è recuperato mediante centrifugazione e trattato come descritto in seguito.

Il *medium* utilizzato per l'espressione inducibile della brazzeina è un terreno minimo di sali come descritto nel manuale *Pichia Fermentation Process Guidelines* (Invitrogen). Dopo 24 ore di crescita l'espressione della proteina è indotta aggiungendo metanolo alla coltura, inizialmente ad una velocità bassa per permettere l'adattamento della coltura al metanolo e poi progressivamente a velocità maggiori al fine di mantenere il livello di ossigeno disciolto richiesto.

Per l'espressione costitutiva della brazzeina è utilizzato un terreno minimo di sali noto (Hohenblum H. *et al.*, 2004) e riportato di seguito in dettaglio all'esempio 4. Dopo 24 ore di crescita si inizia la fase di *feeding* utilizzando una soluzione di destrosio. Si preleva il surnatante mediante centrifugazione ogni 24 ore e sullo stesso si analizza il livello di espressione proteica attraverso Tris-Tricina SDS-PAGE elettroforesi.

Alla fine del processo di fermentazione il terreno è recuperato e sottoposto ai passaggi di purificazione.

Processo di purificazione:

Come riportato nel manuale *EasySelect Pichia Expression Kit* (Invitrogen) *Pichia pastoris* è in grado di crescere ad elevate biomasse in un terreno semplice definito e secerne inoltre un basso livello di proteine native. Di conseguenza la proteina eterologa secreta rappresenta la grande maggioranza del totale delle proteine nel *medium*, rendendo così relativamente facile il processo di purificazione.

Il primo passaggio del processo di purificazione è la rimozione delle cellule dal terreno di coltura mediante centrifugazione. Altri metodi come ad esempio la chiarificazione e la microfiltrazione possono essere utilizzati.

Il surnatante della coltura viene poi diluito per abbassare il valore di conduttività al fine di permettere alle proteine di legarsi al materiale cromatografico; in seguito il

pH finale della soluzione viene modificato in base al tipo di cromatografia a scambio ionico che si vuole utilizzare.

Con una resina a scambio cationico come la Sepharose CM FF a valori di pH attorno a 4.0, solo la brazzeina e pochi altri contaminanti si legano alla resina. È quindi possibile eluire la brazzeina separatamente dalle altre proteine, applicando un gradiente lineare di NaCl alla colonna.

Al contrario, quando si utilizza una resina a scambio anionico, come ad esempio la Sepharose DEAE FF a valori di pH attorno a 5.0, solo i contaminanti presenti nel medium si legano alla resina, permettendo il recupero della brazzeina pura nel volume morto della colonna dopo il caricamento del campione.

In funzione del tipo di cromatografia a scambio ionico scelto per la purificazione, sono richiesti diversi passaggi di concentrazione e di filtrazione, in accordo con le caratteristiche desiderate del prodotto finale.

La soluzione concentrata di brazzeina può essere conservata come soluzione dopo sterilizzazione mediante filtrazione (filtro con pori da 0.22 μ m), o come polvere liofilizzando direttamente la proteina purificata.

Questo processo di purificazione non prevede passaggi chimici pericolosi o costosi ed è quindi idoneo per l'applicazione nell'industria alimentare.

Con il metodo descritto si ottiene la brazzeina non glicosilata adempiendo allo scopo della presente invenzione. La proteina ottenuta ha le caratteristiche qui sotto riportate.

Caratterizzazione del prodotto:

La proteina nel surnatante alla fine della fermentazione viene separata mediante gel elettroforesi e la concentrazione di brazzeina viene stimata dopo colorazione con *Comassie* e analisi densitometrica. La purezza della proteina dopo il passaggio di cromatografia a scambio ionico è stabilita mediante analisi RP-HPLC (come riportato in dettaglio di seguito all'esempio 5).

La spettrometria di massa della proteina purificata ha dato come risultato una massa molecolare pari a 6500.89 $\pm$ 0.67 Da, dato comparabile con quello atteso di 6501 Da. Si può pertanto desumere che la brazzeina non viene degradata da proteasi presenti nel surnatante e che le sole modifiche post-trascrizionali presenti sono i quattro ponti disolfuro tipici della struttura nativa della proteina; altre

modificazioni, quali ad esempio glicosilazioni, che possono alterare la struttura della proteina o mascherarne eventuali siti di taglio proteolitici, non sono presenti. La similarità strutturale della proteina ricombinante così ottenuta con la brazzeina *wild-type* direttamente estratta dalla sua fonte naturale è stata confermata attraverso esperimenti di TOCSY NMR, eseguiti come descritto in letteratura (Gao et al., 1999) (Figure 6A e 6B). Inoltre, come mostrato in figura 6C, la proteina mantiene la sua struttura (e di conseguenza il gusto dolce) anche dopo trattamento al calore a 98 °C per 2 ore. È quindi termostabile.

Un primo passo verso la determinazione della possibile allergenicità della proteina ricombinante è stato fatto mediante test *in vitro* di sensibilità alla pepsina, in accordo con le linee guida generali pubblicate da FAO/WHO (WHO, 2001. *Evaluation of Allergenicity of Genetically modified Foods. Report of a Joint FAO/WHO Expert consultation. World Health Organization*, Ginevra). Come mostrato in figura 7, la proteina è prontamente digerita dalla pepsina dopo 10 minuti di incubazione in condizioni che simulano il fluido gastrico, suggerendo quindi che la brazzeina ricombinante ha una bassa probabilità di essere un allergene e non presenta modifiche strutturali quali ad esempio glicosilazioni che ne impediscano la proteolisi.

La presente invenzione fornisce quindi una proteina dolce, correttamente strutturata, non glicosilata, termostabile e pepsina-sensibile prodotta attraverso il metodo sopra descritto.

La proteina prodotta in questo modo è successivamente caratterizzata usando sia saggi biochimici standard che tecniche di caratterizzazione strutturale, come ad esempio quantificazione UV a 280 nm, elettroforesi in gel di Tris Tricina, HPLC, spettrometria di massa e spettroscopia di risonanza magnetica nucleare.

ESEMPI

Esempio 1. Costruzione di un vettore di espressione per l'espressione inducibile o costitutiva della brazzeina

Il cDNA della brazzeina (SEQ ID NO: 2) è stato sintetizzato chimicamente (Sigma genosys) con l'ottimizzazione dei codoni per l'espressione in *P. pastoris* e quindi clonato nel vettore pPICZ α A.

Il vettore pPICZ α A per l'espressione inducibile della brazzeina è stato ottenuto dall'Invitrogen (San Diego, USA). Tale vettore è stato digerito con XhoI (Promega) e NotI (Promega). Il cDNA della brazzeina è stato legato con il vettore pPICZ α A e poi trasformato nel ceppo di *E. coli* DH5 α . I cloni trasformati (pPICZ α A-bra, SEQ ID NO: 7) sono stati selezionati su piastre LB a basso contenuto di sale (10g/l triptone, 5g/l NaCl, 5g/l estratto di lievito, 15g/l agar) contenenti 25 μ g/ml di ZeocinaTM (Invitrogen). Il plasmide pPICZ α A-bra è stato quindi sequenziato per verificare l'accuratezza della sequenza e quindi usato per l'espressione del gene della brazzeina in *P. pastoris*. Il vettore pPICZ α A comprende il promotore inducibile pAOX1 (SEQ ID NO: 8), la sequenza segnale di secrezione del fattore α di *Saccharomyces cerevisiae* (SEQ ID NO: 9), la sequenza codificante per la brazzeina (SEQ ID NO: 2), il terminatore AOX1 (SEQ ID NO: 10) e il gene Sh ble per la resistenza all'antibiotico ZeocinaTM (SEQ ID NO: 11), come riportato in Fig.1.

Il promotore pGAP (SEQ ID NO: 12) è stato invece amplificato mediante PCR direttamente dal genoma di *P. pastoris* (chr 4). I primer *forward* e *reverse* utilizzati per l'amplificazione del gene GAP sono 5'-CACTTGACAGGATCCTTTTTTGTAG-3' (SEQ ID NO: 13) e 3'-CATCGTTTCGAAATAGTTGTTCAATTG-5' (SEQ ID NO: 14). Il prodotto di PCR è stato poi inserito nel plasmide pPICZ α A-bra al posto del pAOX1 per generare il plasmide pGAPZ α A-bra (SEQ ID NO: 15). Il processo di costruzione del plasmide pGAP-bra è mostrato in Fig. 3. Come per il vettore pPICZ α A-bra, il vettore pGAPZ α A-bra è stato trasformato nel ceppo DH5 α di *E. coli* e poi sequenziato per verificare la correttezza della sequenza.

Esempio 2. Trasformazione delle cellule di *P. pastoris* con i vettori per l'espressione della brazzeina mediante elettroporazione

Le cellule del ceppo X33 di *P. pastoris* elettrocompetenti sono state acquistate da Invitrogen (No catalogo K1740-01) preparate usando il protocollo suggerito nel manuale *EasyselectTM Pichia expression kit* (Invitrogen): un'aliquota di cellule competenti di *P. pastoris* risospesa in 1M sorbitolo a 0°C (80 μ l) è stata mescolata con 10 μ g di DNA linearizzato (risospeso in 10 μ l di acqua sterile). Il plasmide pPICZ α A-bra è stato linearizzato con l'enzima di restrizione SacI (Promega; No

catalogo R6061). Invece, il plasmide pGAPZ α A-bra è stato linearizzato con AvrII (New England BioLabs; No catalogo R0174S).

La miscela è stata trasferita in una cuvetta per elettroporazione da 0.2 cm pre-raffreddata a 0°C e incubata in ghiaccio per 5 minuti. Le cellule sono state quindi elettroporate utilizzando un elettroporatore Biorad Gene Pulser II a 1500V, 25 μ F, e 400 Ω .

Le cellule trasformate sono state incubate con 1 ml di sorbitolo 1M (0°C) a 30°C per 2 ore.

Le cellule sono state quindi seminate su piastre YPDS (10 g/l estratto di lievito, 20 g/l peptone, 20g/l destrosio, 1M sorbitolo, and 20 g/l agar) contenenti 100 μ g/ml di Zeocina™ come marker di selezione. Le piastre sono state incubate per 3-5 giorni a 30°C fino alla formazione delle colonie.

Esempio 3. Identificazione delle cellule di *P. pastoris* trasformate e test di espressione su piccola scala

I cloni trasformati che presentano il più alto livello di espressione sono stati selezionati su piastre YPDS contenenti 100, 500, 1000 e 2000 μ g/ml Zeocina™ e incubati a 30°C per 5 giorni. I cloni in grado di crescere sulle piastre con 2000 μ g/ml Zeocina™ sono i putativi cloni multi-copia (ossia che contengono più copie del gene codificante per la brazzeina).

Le colonie selezionate possono essere conservate a -80°C in terreno YPD (10 g/l estratto di lievito, 20 g/l peptone, 20 g/l destrosio) contenente 15% glicerolo v/v.

I lieviti trasformati con il plasmide per l'espressione inducibile sono stati risospesi in 5 ml di terreno BMG (100 ml/l tampone potassio fosfato 1M a pH 6.0, 100 ml/l 10X YNB, 2 ml/l 0.02% biotina, 100ml/l 10% glicerolo) e incubati in beute Erlenmeyer da 25 ml per tutta la notte.

Queste colture sono state utilizzate per inoculare 10 ml di terreno BMM (100 ml/l tampone potassio fosfato 1M a pH 6.0, 100 ml/l 10X YNB, 2 ml/l 0.02% biotina, 100 ml/l 5% metanolo) in beute Erlenmeyer da 50 ml con frangiflutti ad un OD iniziale pari a 1. Tali colture sono state poi incubate a 28°C per 3 giorni in agitazione a 230 rpm; ogni 24 ore del metanolo 100% è stato aggiunto ad una concentrazione finale dello 0.5% al fine di mantenere l'induzione.

Le singole colonie selezionate per l'espressione costitutiva sono state trasferite in 5 ml di terreno YPD (10 g/l estratto di lievito, 20 g/l peptone, 20 g/l destrosio) e incubate in beute Erlenmeyer da 25 ml per tutta la notte. Queste colture sono state utilizzate per inoculare 10 ml di terreno YPD in beute Erlenmeyer da 50 ml con frangiflutti ad un OD iniziale pari a 1. Tali colture sono state poi incubate a 28°C per 3 giorni in agitazione a 230 rpm.

Il surnatante di queste colture è stato ottenuto mediante centrifugazione ogni 24 ore e utilizzato per analizzare l'espressione proteica attraverso Tris-Tricine SDS-PAGE elettroforesi.

Mediante questo passaggio è stato quindi isolato il clone che presenta la maggior efficienza di espressione che verrà poi usato per il successivo scale-up del processo in fermentatore.

Esempio 4. Espressione della brazzeina in fermentatore

Il clone più efficiente in termini di espressione di brazzeina è stato selezionato e fatto crescere in 500 ml di terreno contenente 100 ml/l tampone fosfato, 100 ml/l YNB 10X, 2.5 ml/l biotina 500X, 5 ml/l 100% glicerolo, e 792.5 ml/l acqua distillata. Tale coltura è stata utilizzata per inoculare la coltura per il fermentatore (1.5 l) ad un OD iniziale pari a 1; il terreno di fermentazione contiene 18.2 g/l K_2SO_4 , 14.9 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 26.7 ml/l H_3PO_4 (85%), 0.93 g/l $CaSO_4 \cdot 2H_2O$, 4.13 g/l KOH, 40 g/l glicerolo, 4.35 ml/l PTM₁. La soluzione di sali in tracce (PTM₁) consiste in (per litro): 6.0g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.08g NaI, 3.0g $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0.2g $Na_2MnO_4 \cdot 2H_2O$, 0.02g H_3BO_3 , 0.5g $CoCl_2$, 20.0g $ZnCl_2$, 65.0g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2g Biotina e 5.0 ml H_2SO_4 . La coltura è stata fatta crescere per 18-24 ore fino al completo consumo del glicerolo (ciò è indicato da un rapido aumento del livello di ossigeno disciolto). Quando tutto il glicerolo è stato consumato, è stata iniziata una fase *fed-batch* con metanolo per indurre l'espressione della proteina; il medium di *feeding* consiste in metanolo 100% contenente 12 ml/l PTM₁. Per le prime 2-3 ore, finché la coltura si adatta al metanolo, la velocità di *feeding* è stata impostata a 3.6 ml/h per litro di volume iniziale di fermentazione. Quando la coltura si è adattata all'utilizzo del metanolo la velocità di *feeding* è stata raddoppiata a 7.3 ml/h per litro di volume iniziale di fermentazione. Dopo due ore a 7.3 ml/h/litro, la velocità di *feeding* del metanolo è stata aumentata a 10.9 ml/h per

litro di volume iniziale di fermentazione. Tale velocità è stata mantenuta fino alla fine della fermentazione.

La fermentazione per l'espressione costitutiva della brazzeina è stata effettuata in 1.5 litri di terreno contenente 9.5 g/l K_2SO_4 , 7.8 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 23.7 ml/l H_3PO_4 (85%), 0.6 g/l $CaSO_4 \cdot 2H_2O$, 2.6 g/l KOH, 40 g/l glicerolo, 4.4 ml/l PTM_1 . La singola colonia di lievito selezionata per l'espressione è stata inoculata in 500 ml di terreno contenente 100 ml/l tampone fosfato, 100 ml/l YNB 10X, 2.5 ml/l biotina 500X, 5 ml/l 100% glicerolo, and 792.5 ml/l acqua distillata, e usata come coltura per inoculare il terreno del fermentatore ad un OD iniziale pari a 1. La coltura è stata fatta crescere per 24 ore e poi è stata iniziata una fase *fed-batch* con glucosio (soluzione di *feeding*: 550 g/l glucosio, 12 ml/l PTM_1) ad una velocità di 6 ml/h per litro di volume iniziale di fermentazione e mantenuta fino alla fine della fermentazione.

Alla fine di entrambi i processi di fermentazione (72 ore di fase *fed-batch*) il terreno è stato recuperato e centrifugato a 1500g al fine di separare le cellule dal surnatante. Per fermentazioni su scala maggiore possono essere utilizzati altri metodi come ad esempio la filtrazione tangenziale.

Esempio 5. Processo di purificazione

Cromatografia a scambio cationico

Il surnatante ottenuto in seguito a rimozione delle cellule è stato diluito 4.6 volte per abbassare la conduttività da 65 mS/cm a 14 mS/cm e il pH è stato portato a 4.0. Un'aliquota della soluzione è stata caricata in gel di Poliacrilammide (vedi Figura 4D, Lane 2). L'intero surnatante è stato quindi caricato in una colonna Pharmacia Biotech XK 26, riempita con 110 ml di Sepharose CM FF, pre-equilibrata con Buffer A (tampone Na-Acetato 20mM, pH4). E' stato quindi raccolto il *flow through* contenente la frazione che non si è legata alla resina in seguito a caricamento del campione e lavaggio con Buffer A, (Frazione I, Figura 4A) e un'aliquota è stata caricata in gel (Figura 4D, Linea 3). In seguito alla prima fase di lavaggio della colonna la concentrazione di Buffer B (NaCl 1M in tampone Na-Acetato 20mM, pH 4), è stata fatta aumentare linearmente dallo 0% al 100% in 3.5 volumi colonna. Due frazioni sono state raccolte e caricate in gel (vedi Frazione II e III in Figura 4D). La brazzeina può essere separata dalle altre proteina legate

alla colonna in quanto eluisce a concentrazioni più elevate di Buffer B (approssimativamente 0.6 M NaCl). In alternativa, il processo cromatografico può essere effettuato usando una eluizione a 2 step; il primo step al 40% di Buffer B per rimuovere i contaminanti non desiderati ed un secondo step al 60-70% di Buffer B per eluire la brazzeina. I successivi step di diafiltrazione possono essere effettuati usando membrane con pori di diametro da 1 a 3.5 kDa.

Alla fine del processo di purificazione descritto si ottengono non meno di 200 mg di proteina.

Cromatografia a scambio anionico

Il surnatante ottenuto in seguito a rimozione delle cellule, è stato diluito in modo tale da raggiungere una conduttività finale pari a 5 mS/cm e il pH portato a 5 (in questo caso, il valore può essere impostato nell'intervallo 4-6). La soluzione così ottenuta è stata caricata in una colonna contenente DEAE Sepharose FF, pre-equilibrata con Buffer C (Piperazina-HCl 20 mM, pH 5). La brazzeina pura eluisce nel *flow through* dopo il caricamento del campione e lavaggi con Buffer C, mentre gli altri contaminanti sono eluiti lavando la colonna con NaCl 1M. In confronto al metodo di purificazione che sfrutta lo scambio cationico, questo metodo consente di recuperare proteina purificata semplicemente in Buffer C in assenza di NaCl, tuttavia:

- il surnatante di partenza deve essere diluito approssimativamente di un fattore 10;
- la proteina eluisce in volumi più grandi e richiede ulteriori passaggi di concentrazione.

Purezza della proteina

E' stato monitorato il profilo di assorbanza a 280 nm di una cromatografia in fase inversa HPLC e la purezza della brazzeina è stata riportata come la percentuale relativa di area del picco di eluizione della brazzeina rispetto all'area totale sottesa dal cromatogramma. Un'aliquota di Frazione III (vedi Figura 4B) è stata caricata in una colonna Phenomenex Jupiter 5u C4; l'eluente A utilizzato è composto dallo 0.1% TFA in H₂O milliQ, mentre l'eluente B è formato dallo 0.085% TFA in Acetonitrile. La corsa cromatografica sfrutta un gradiente non lineare crescente di Eluente B con un flusso a 0.6 ml/min. La purezza della proteina a 280 nm è stata

stimata essere del 99.9% usando un *diode-array Agilent 8453 UV-visible spectrophotometer* interfacciato al *software Agilent Chemostation*.

Referenze

Ming, D. & Hellekant, G. 1994, "Brazzein, a new high-potency thermostable sweet protein from *Pentadiplandra brazzeana* B", *FEBS letters*, vol. 355, no. 1, pp. 106-108.

Berlec, A., Jevnikar, Z., Majhenic, A.C., Rogelj, I. & Strukelj, B. 2006, "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*, vol. 73, no. 1, pp. 158-165.

Cregg, J.M., Vedvick, T.S. & Raschke, W.C. 1993, "Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*", *Bio/technology (Nature Publishing Company)*, vol. 11, no. 8, pp. 905-910.

Cereghino, J.L. & Cregg, J.M. 2000, "Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*", *FEMS microbiology reviews*, vol. 24, no. 1, pp. 45-66.

Miles L., Louie M. Subramanian M. WO 2010/030999.

EFSA (2008) Safety of 'Ice Structuring Protein (ISP) - Scientific Opinion of the Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies and of the Panel on Genetically Modified Organisms EFSA.

Knauer, R. & Lehle, L. 1999, "The oligosaccharyltransferase complex from yeast", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 1426, no. 2, pp. 259-273.

Cregg, J.M., Cereghino, J.L., Shi, J. & Higgins, D.R. 2000, "Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*", *Molecular biotechnology*, vol. 16, no. 1, pp. 23-52.

Hohenblum, H., Gasser, B., Maurer, M., Borth, N. & Mattanovich, D. 2004, "Effects of gene dosage, promoters, and substrates on unfolded protein stress of recombinant *Pichia pastoris*", *Biotechnology and bioengineering*, vol. 85, no. 4, pp. 367-375.

Gao, G., Dai, J., Ding, M., Hellekant, G., Wang, J. & Wang, D. 1999, "Studies on solution NMR structure of brazzein: Secondary structure and

molecular scaffold", *Science in China. Series C, Life sciences / Chinese Academy of Sciences*, vol. 42, no. 4, pp. 409-419.

Rivendicazioni

1. Metodo di preparazione della proteina brazzeina comprendente almeno i passaggi di:
 - trasformare una o più cellule di *Pichia pastoris*, con un vettore di espressione comprendente un promotore, una sequenza nucleotidica codificante per una sequenza di brazzeina ed un terminatore ed opzionalmente una sequenza segnale di secrezione;
 - crescere la cellula o le cellule così trasformate in un mezzo di fermentazione in condizioni aerobiche,caratterizzato dal fatto che la cellula o le cellule di *Pichia pastoris* sono del ceppo X33 e la proteina brazzeina prodotta dalla cellula o dalle cellule trasformate è una proteina non glicosilata.
2. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui la sequenza nucleotidica codificante per una sequenza di brazzeina è scelta tra le sequenze nucleotidiche SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 3.
3. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui la sequenza nucleotidica codificante per una sequenza di brazzeina è la sequenza nucleotidica SEQ ID NO: 1.
4. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui il promotore è scelto tra pFLD1, pILC1, pTEF1, pPGK1, pPEX8, pAOX1 e pGAP.
5. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui il promotore è scelto tra pAOX1 e pGAP.
6. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui il terminatore è scelto tra AOX1 e GAP.
7. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui il terminatore è AOX1.
8. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui la sequenza segnale di secrezione è scelta tra α -mating factor di *Saccharomyces cerevisiae*, fosfatasi acida di *Pichia pastoris* PHO1 e invertasi di *Saccharomyces cerevisiae* SUC2.
9. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui la sequenza segnale di secrezione è α -mating factor di *Saccharomyces cerevisiae*.
10. Metodo secondo la rivendicazione 1, comprendente gli ulteriori passaggi:

- rimozione delle cellule dal mezzo di fermentazione mediante centrifugazione o microfiltrazione;
 - diluizione del surnatante e regolazione del pH;
 - separazione della proteina brazzeina espressa per cromatografia a scambio ionico;
 - concentrazione e purificazione per diafiltrazione;
 - opzionalmente, liofilizzazione della proteina isolata.
11. Proteina brazzeina ottenibile con il metodo definito alle rivendicazioni da 1 a 9 in cui tale proteina è non glicosilata.
 12. Un vettore di espressione per la proteina brazzeina in cui la sequenza nucleotidica codificante per una sequenza di brazzeina è la sequenza SEQ ID NO: 1.
 13. Una cellula ricombinante di *Pichia pastoris* ceppo X33 comprendente nel suo genoma almeno una copia del costrutto genico in cui la sequenza nucleotidica codificante per una sequenza di brazzeina è scelta tra le sequenze nucleotidiche SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 3.
 14. Una cellula ricombinante di *Pichia pastoris* ceppo X33 secondo la rivendicazione 13, in cui la sequenza nucleotidica codificante per una sequenza di brazzeina è la sequenza nucleotidica SEQ ID NO: 1.
 15. Una cellula ricombinante di *Pichia pastoris* ceppo X33 secondo la rivendicazione 13, in cui il costrutto genico comprende ulteriormente un promotore scelto tra pAOX1 e pGAP, la sequenza segnale di secrezione α -*mating factor* di *Saccharomyces cerevisiae* ed il terminatore scelto tra AOX1 e GAP.

(S.L./sf-PD)

Claims

1. A method for preparing brazzein protein comprising at least the steps of:
 - transforming one or more cells of *Pichia pastoris* with an expression vector comprising a promotor sequence, a brazzein reading frame sequence, a termination sequence and optionally a secretion signal sequence;
 - growing the transformed cell or cells in a fermentation medium under aerobic conditions,characterized by the fact that the cell or cells of *Pichia pastoris* are of X33 strain and the brazzein protein obtained from said transformed cell or cells is a non-glycosilated protein.
2. The method according to claim 1, wherein the reading frame sequence of brazzein is selected from the nucleotidic sequences SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 and SEQ ID NO: 3.
3. The method according to claim 1, wherein the brazzein reading frame sequence is SEQ ID NO: 1.
4. The method according to claim 1, wherein the promotor sequence is selected from pFLD1, pILC1, pTEF1, pPGK1, pPEX8, pAOX1 and pGAP.
5. The method according to claim 1, wherein the promotor sequence is selected from pAOX1 and pGAP.
6. The method according to claim 1, wherein the termination sequence is selected from AOX1 and GAP.
7. The method according to claim 1, wherein the termination sequence is AOX1.
8. The method according to claim 1, wherein the secretion signal sequence is selected from α -mating factor of *Saccharomyces cerevisiae*, acid phosphatase of *Pichia pastoris* PHO1 and invertase of *Saccharomyces cerevisiae* SUC2.
9. The method according to claim 1, wherein the secretion signal sequence is α -mating factor of *Saccharomyces cerevisiae*.
10. The method according to claim 1 further comprising the steps of:

- removing the cells from the fermentation medium by means of centrifugation or microfiltration;
 - diluting the supernatant and adjusting the pH;
 - separating the expressed brazzein protein by ion-exchange chromatography;
 - concentrating and diafiltering the protein;
 - optionally, subjecting the isolated protein to lyophilization.
11. Brazzein protein obtainable with the method of preparation as defined in claims from 1 to 10, wherein the brazzein protein is non-glycosylated.
 12. An expression vector for brazzein protein wherein the brazzein reading frame sequence is the sequence SEQ ID NO: 1.
 13. A recombinant cell of *Pichia pastoris* X33 strain comprising at least one copy of the gene construct wherein the brazzein reading frame sequence is selected from the nucleotide sequences SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 and SEQ ID NO: 3.
 14. The recombinant cell of *Pichia pastoris* X33 strain according to claim 13, wherein the brazzein reading frame sequence is the nucleotide sequence SEQ ID NO: 1.
 15. The recombinant cell of *Pichia pastoris* X33 strain according to claim 13, wherein the gene construct further comprises a promoter sequence selected from pAOX1 and pGAP, the secretion signal sequence α -mating factor of *Saccharomyces cerevisiae* and a termination sequence selected from AOX1 and GAP.

FIGURA 1

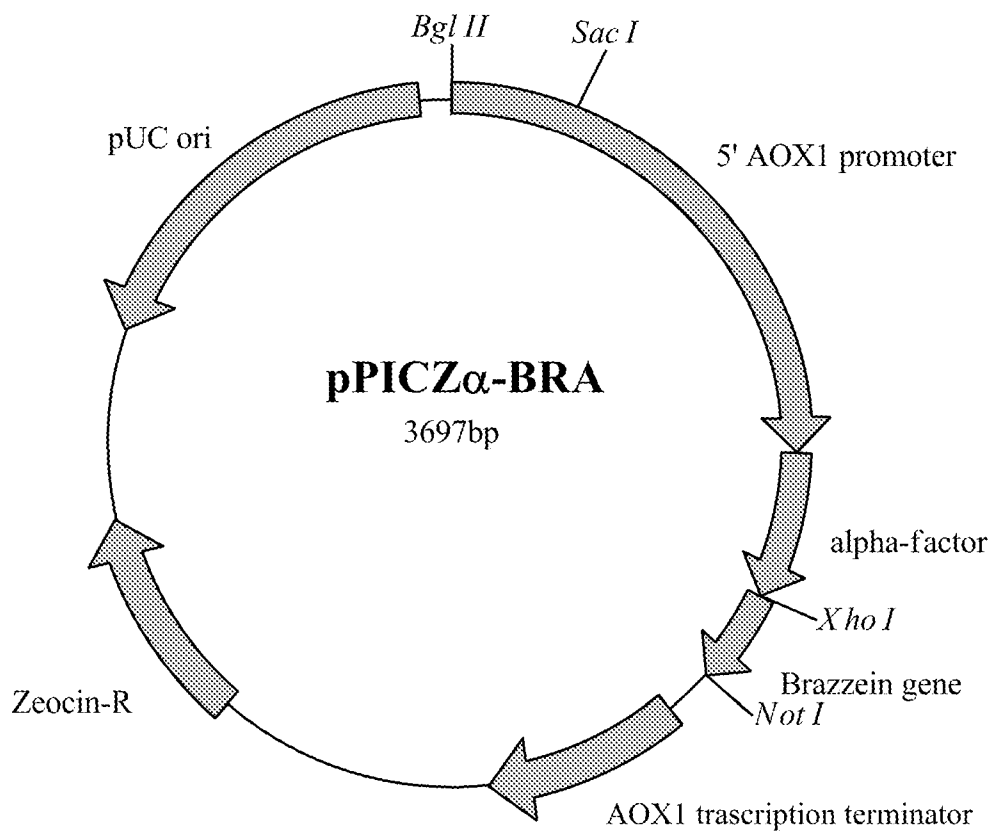


FIGURA 2

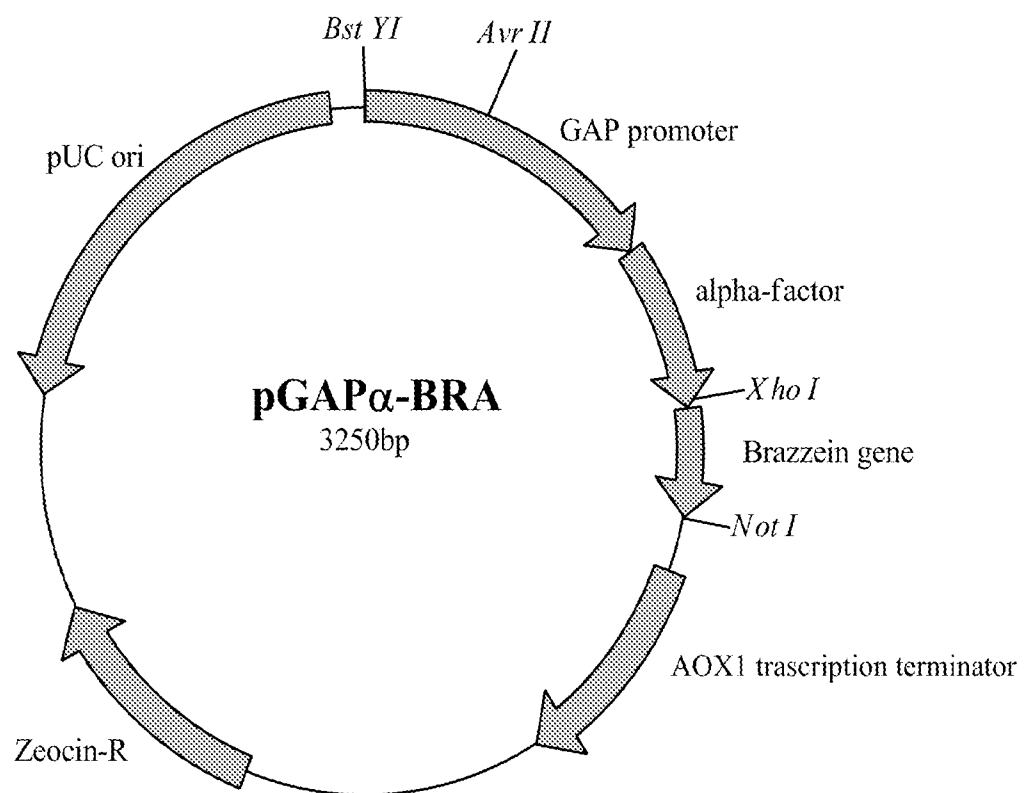


FIGURA 3

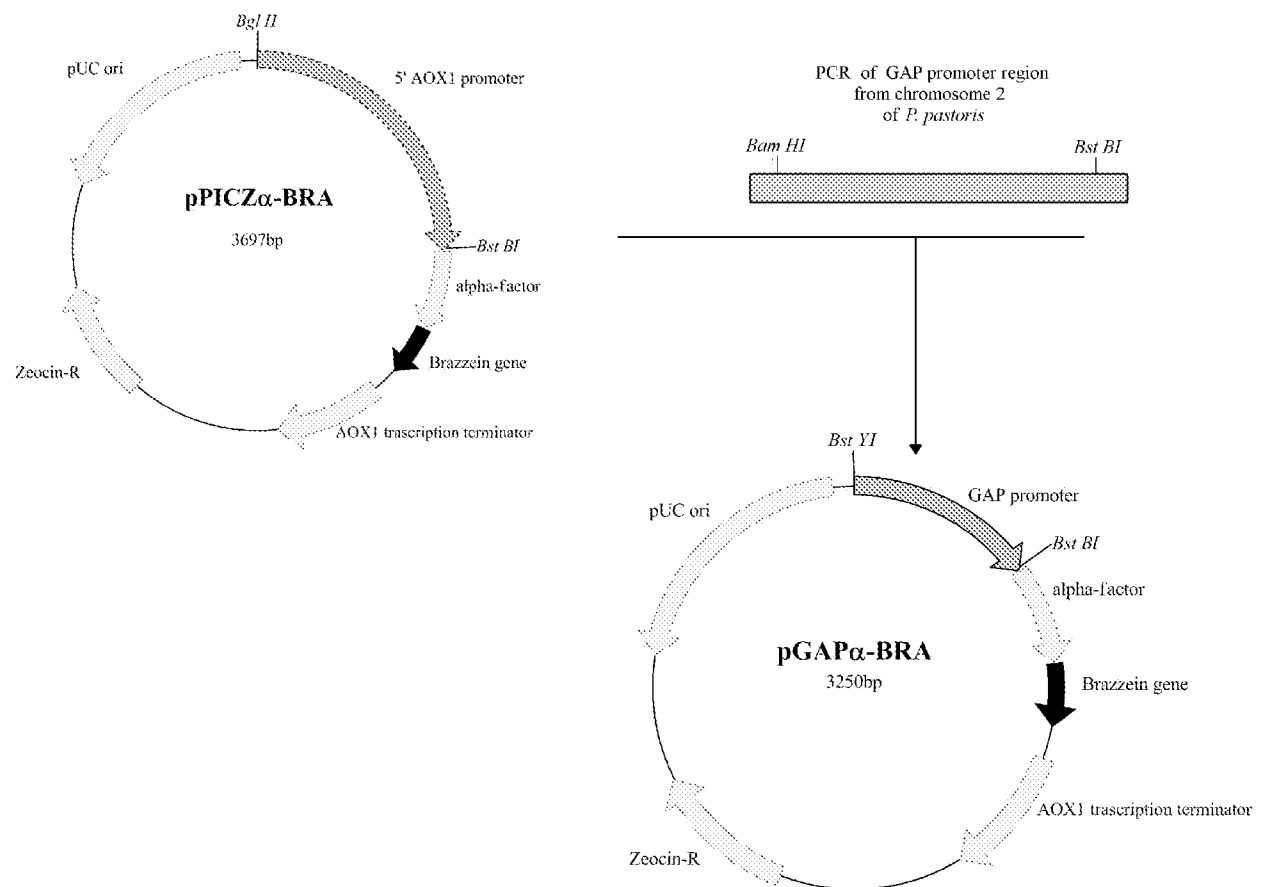
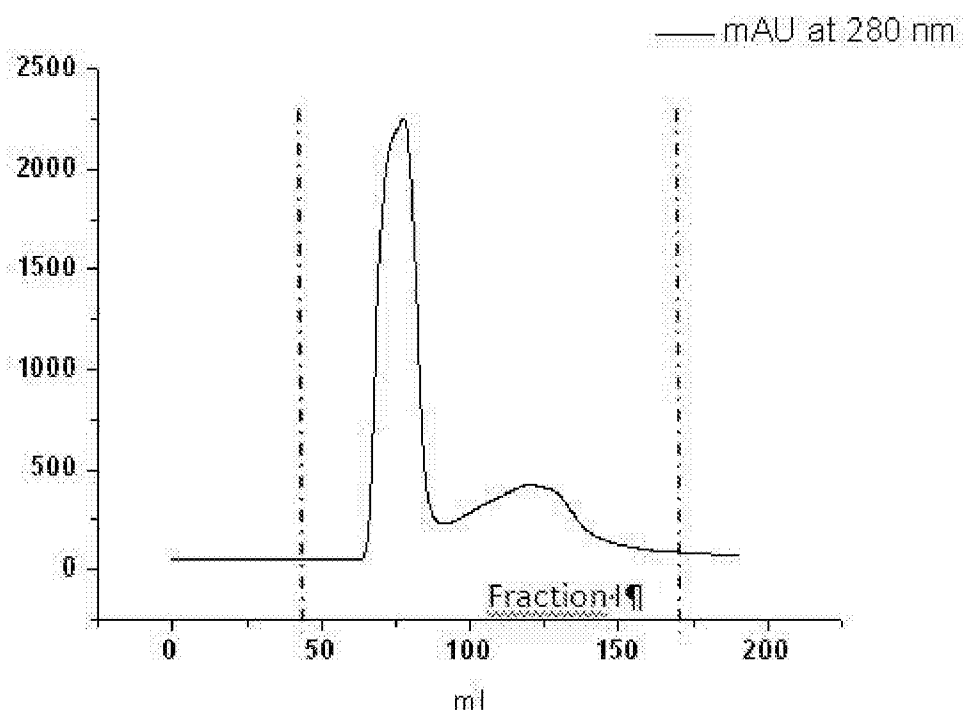


FIGURA 4

A



B

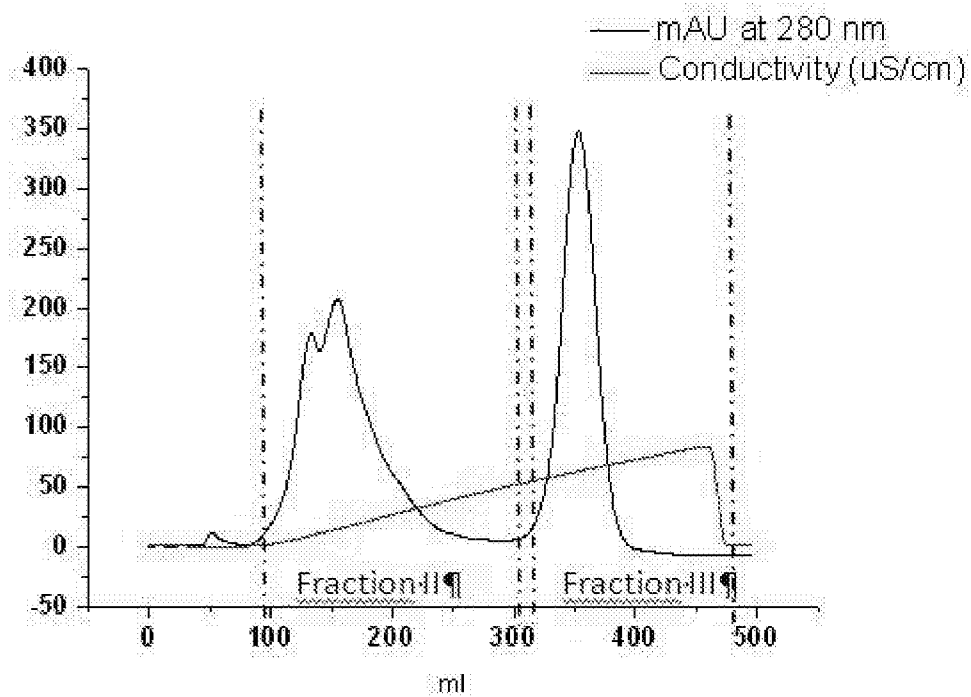


FIGURA 4

C

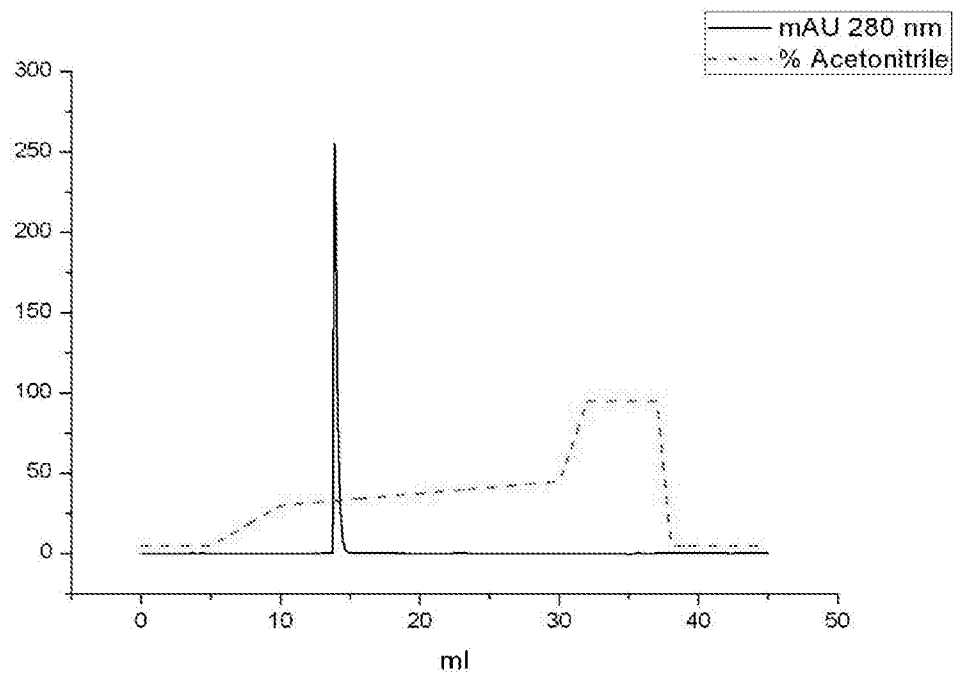
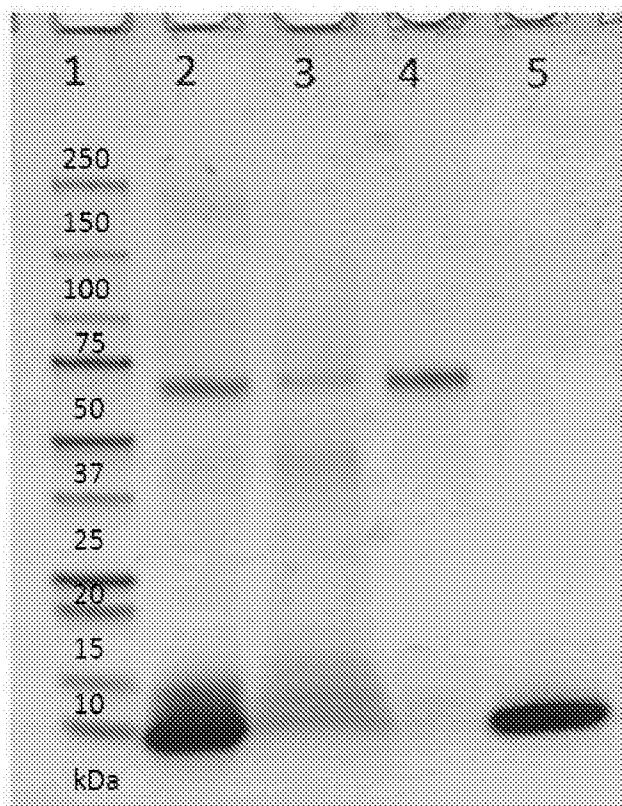


FIGURA 4

D



A

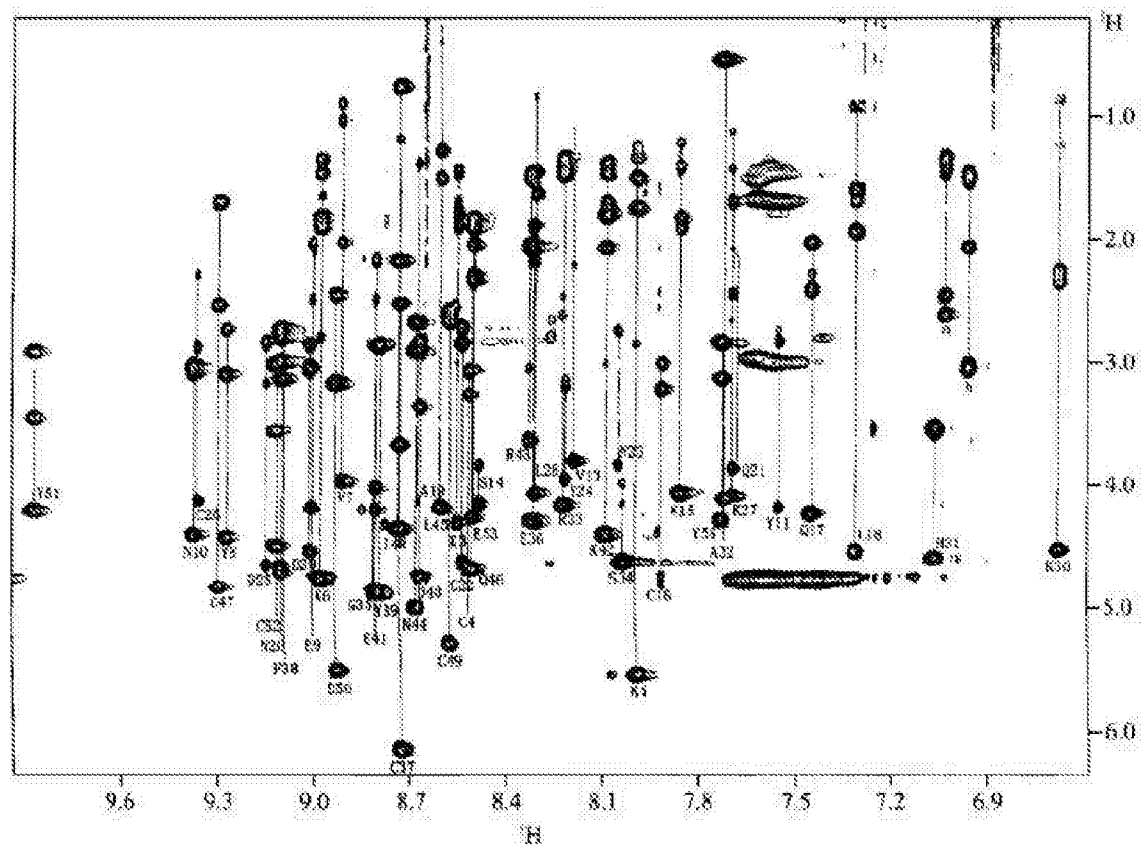


FIGURA 5

B

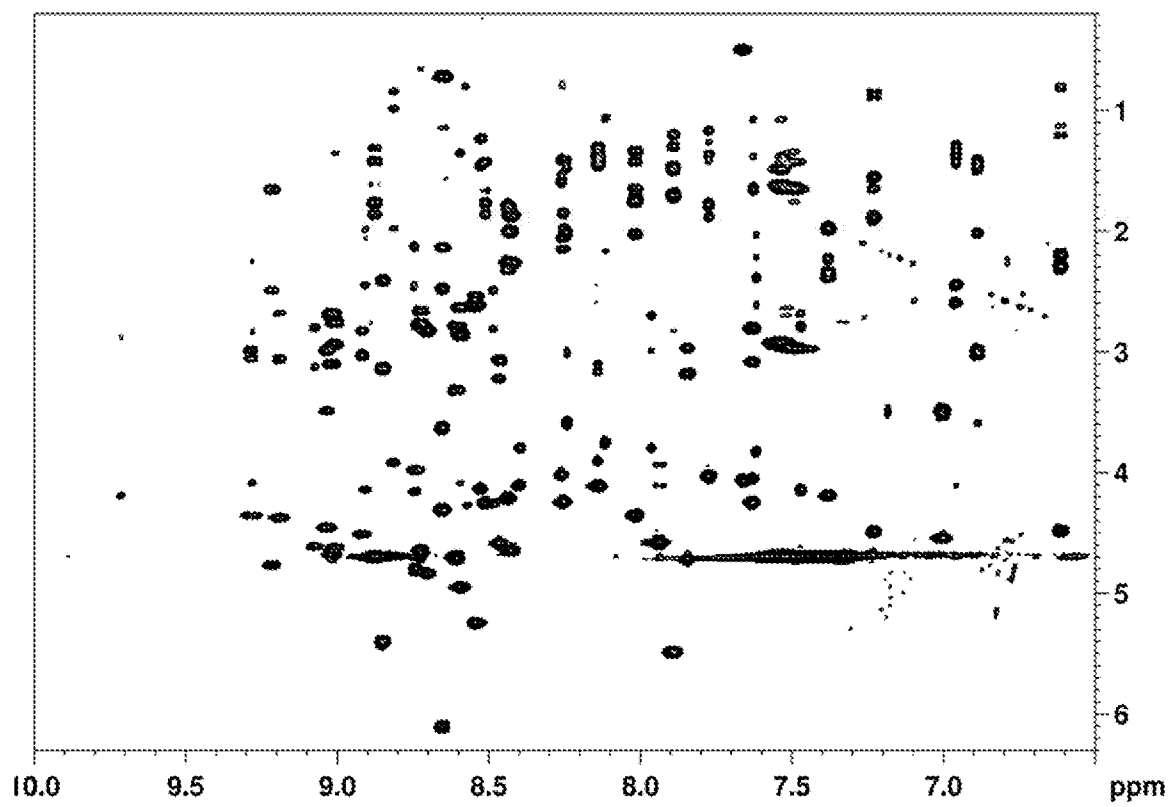


FIGURA 5

C

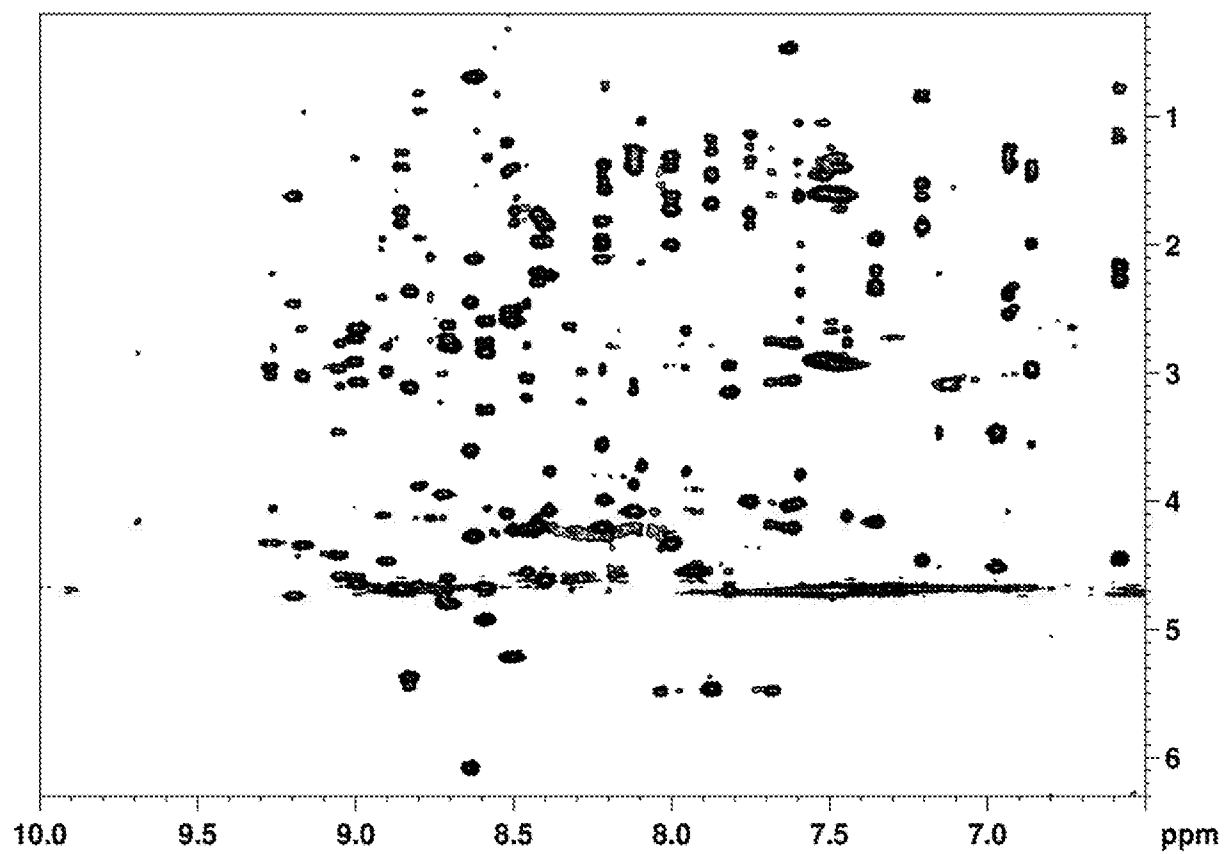


FIGURA 6

