



CELLEBASERET PRODUKTION AF MÆLKEBESTANDDELE

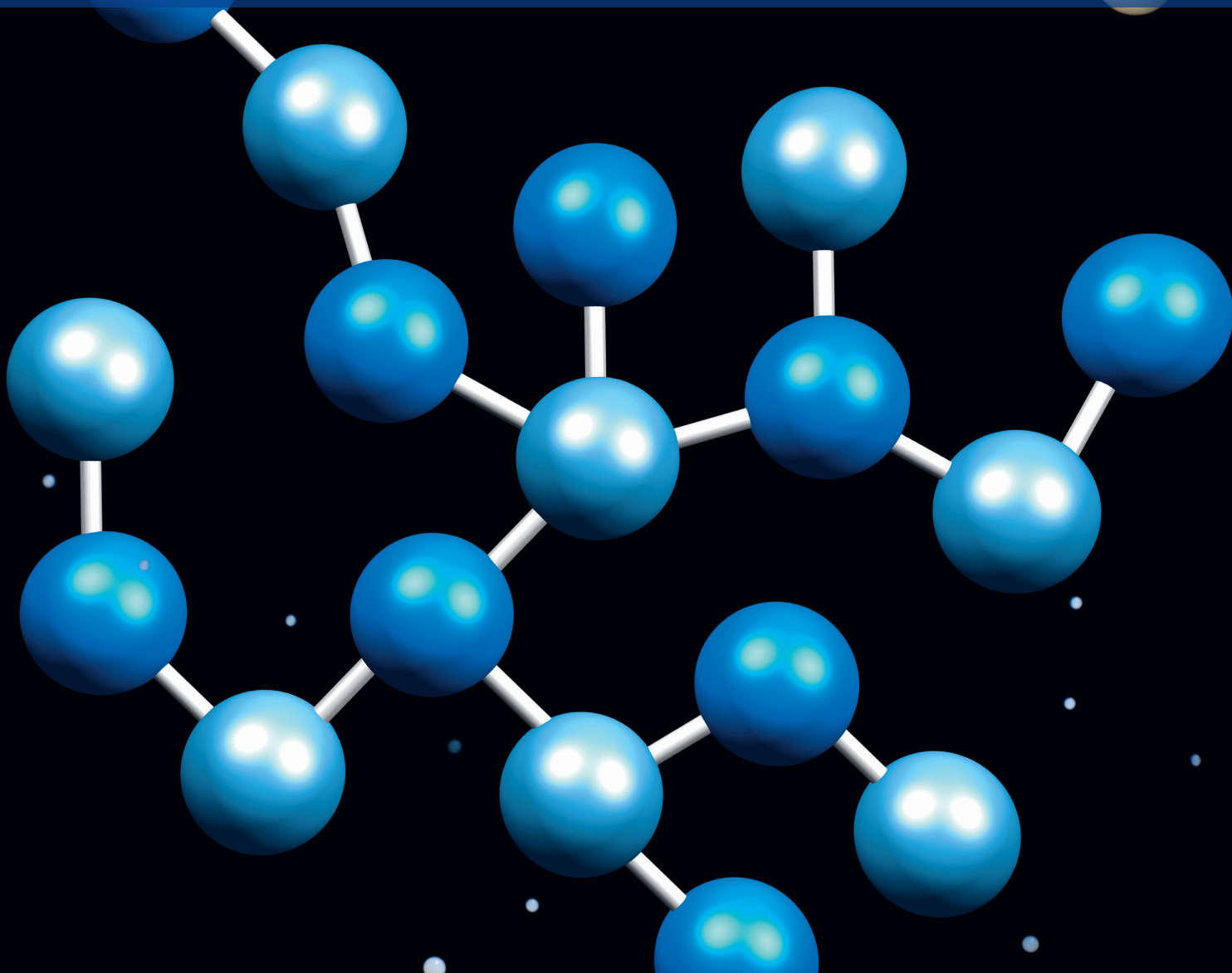
NINA AAGAARD POULSEN, ANDREAS KVIST, JULIA PRANGCHAT STUB THOMSEN, JING CHE,
ZAHRA SATTARI OG LOTTE BACH LARSEN

DCA RAPPORT NR. 232 · OKTOBER 2024 · FORMIDLING



AARHUS
UNIVERSITET

DCA - NATIONALT CENTER FOR FØDEVARER OG JORDBRUG



CELLEBASERET PRODUKTION AF MÆLKEBESTANDDELE

DCA rapport nr. 232 • DCA – Nationalt Center for Fødevarer og Jordbrug • Formidlingsrapport

FORFATTERE:

Nina Aagaard Poulsen, Andreas Kvist, Julia Prangchat Stub Thomsen, Jing Che, Zahra Sattari
og Lotte Bach Larsen

Institut for Fødevarer
Aarhus Universitet



Datablad

Titel:	Cellebaseret produktion af mælkebestanddele
Serie og nummer:	DCA rapport nr. 232
Rapporttype:	Formidling
Udgivelsesår:	Oktober 2024. 1. udgave. 1. oplag
Forfattere:	Associated Professor Nina Aagaard Poulsen, Researcher Andreas Kvist, Ph.D. student Julia Prangchat Stub Thomsen, Ph.D. student Jing Che, Ph.D. Zahra Sattari, Professor Lotte Bach Larsen, Institut for fødevarer, Aarhus Universitet
Fagfællebedømmelse:	Adjungeret professor, AAU, seniorforsker Stig Purup, Institut for husdyr- og veterinærvidenskab – AVINET Sundhed for tarm og vært (GHH), Aarhus Universitet
Kvalitetssikring, DCA:	Akademisk medarbejder Leslie Freya Höft, Akademisk medarbejder Rebekka Kjeldgaard Kristensen, DCA Centerenheden, AU
Rekvirent:	Food and Biocluster Denmark
Journalnummer:	2024-0756088
Finansiering:	Rapporten er baseret på midler fra Food and Biocluster Denmark
Eksterne kommentarer:	Nej
Eksterne bidrag:	Nej
Kommentarer til besvarelse:	Intet at bemærke
Citeres som:	Poulsen, N.A., Kvist, A., Thomsen, J.P.S., Che, J., Sattari, Z., Larsen, L.B. 2024. Cellebaseret produktion af mælkebestanddele. 41 sider. Formidlingsrapport fra DCA – Nationalt Center for Fødevarer og Jordbrug, Aarhus Universitet, DCA rapport nr. 232
Layout:	Rapportkoordinator Jette Ilkjær, DCA – Nationalt Center for Fødevarer og Jordbrug, AU
Fotos:	Colourbox
Sideantal:	39
ISBN:	Trykt version: 978-87-94420-49-5. Elektronisk version: 978-87-94420-50-1
ISSN:	2248-1684
Tryk:	DigiSource.dk
Internetversion:	https://dcapub.au.dk/djfpublikation/index.asp?action=show&id=1520

Forord

Denne vidensyntese er udarbejdet for Food & Bio Cluster Denmark. Den har til formål at præsentere status for cellebaseret produktion af mælkebestanddele ved brug af to forskellige teknologier: Præcisionsfermentering og kultiveret mælk. Heri udlægges den nuværende viden og de muligheder og udfordringer, der kan være ved de to systemer i forhold til fremtidig produktion af mælkebestanddele og deres anvendelse i fødevarer. Syntesen præsenterer også igangværende forskning på området udført på Institut for Fødevarer, Aarhus Universitet.

Indholdsfortegnelse

Forord	4
Indledning.....	6
1 Komælk	7
2 Fermentering i fødevareproduktion	9
2.1 Biomasse- og traditionel fermentering.....	9
2.2 Præcisionsfermentering.....	9
2.3 Produktionsprocessen.....	12
2.4 Produktion af mælkeproteiner.....	13
2.5 Udfordringer.....	18
2.5 Fremtidsperspektiver	21
3 Fremstilling af mælkebestanddele i kultiverede yverceller	23
3.1 Celler, medier og systemer til kultivering.....	23
3.2 Udfordringer.....	27
3.3 Fremtidsperspektiver	28
4 Forskningsinitiativer indenfor cellebaseret produktion af mælkebestanddele ved Institut for Fødevarer, Aarhus Universitet.....	30
4.1 DECIPHER	30
4.2 CleanPro.....	30
4.3 CleanMilk.....	31
5 Referencer.....	32

Indledning

Som en del af den grønne omstilling er der på verdensplan et betydeligt momentum for at finde nye strategier for produktion af mælk og kød. Alternative proteiner til brug i mælke- og mejeriprodukter som erstatning eller supplement til de animalske proteiner kan udgøres af planteprotein, proteiner fra mikrobiel fermentering såsom præcisionsfermentering eller mælkekomponenter udtrykt af kultiverede yverceller (Pedersen, Møller, and Dalsgaard 2023; Eisner 2024). Præcisionsfermentering af mælkeproteiner omfatter brugen af rekombinante mikroorganismer (bakterier, gær og svampe), mens kultiveret mælk er baseret på dyrkning af animalske celler fra mælkekirtelvæv. Teknologien til præcisionsfermentering er veletableret, mens cellesystemer til produktion af kultiveret mælk stadig er på udviklingsstadiet (Pedersen, Møller, and Dalsgaard 2023). Med fortsat udvikling kan disse teknologier potentielt bidrage til fremstilling af nye og innovative fødevareprodukter med lavere klima- og miljøaftryk, samt blandingsprodukter med optimeret smag, funktionalitet og næringsværdi (Ferrocino, Rantsiou, and Cocolin 2022; Roadmap ProteinFrontiers 2024).

Denne rapport starter med en gennemgang af bestanddelene i komælk for at give en baggrund for mælkebestanddelenes rolle og betydning for mælkens værdi og egenskaber og dermed også bedre at kunne forstå vigtigheden af de beskrevne teknologier i forhold til det mulige cellebaserede slutprodukt. Herefter beskrives teknologien bag præcisionsfermentering og der gives et overblik over forskningslitteraturen inden for produktion af rekombinante mælkeproteiner med mikroorganismer. Dernæst adresseres de nuværende udfordringer og fremtidsperspektiver i forbindelse med anvendelsen af præcisionsfermentering til produktion af mælkeproteiner med fødevareformål. Efterfølgende beskrives teknologien bag kultiveret mælk og hvor den nuværende forskningsindsats ligger. Dernæst adresseres aktuelle udfordringer og fremtidsperspektiver forbundet med brugen af denne metode til fremstilling af mælkeproteiner med fødevareformål. I den sidste del af denne syntese præsenteres igangværende forskning inden for de to områder udført på Institut for Fødevarer, Aarhus Universitet.

1 Komælk

Komælk er en kolloid opløsning bestående af en sammenhængende vandfase, hvori kaseinmiceller og øvrige proteiner (valleproteiner) er opløst. Derudover indeholder komælk fedtstoffer, som er organiseret i mælkefedtkugler, laktose, mineraler og vitaminer m.m. En stor del af mineralerne findes bundet i kaseinmicellerne. Hovedbestanddelene i komælk omfatter ca. 87,1% vand, 4,8% laktose, 4,0% fedt, 3,5% protein, 0,18 % salt og 0,7 % vitaminer og mineraler (Fox and Kelly 2012).

De bestanddele, som findes i mælk, kan enten være udskilt fra mælkekirtlens epithelvæv, fra celler der findes naturligt i mælk (immunceller og enkelte epithelceller), være overført fra blodet via blod-mælkebarrieren i mælkekirtlen eller stamme fra mikroorganismer i mælken. Det største bidrag til mælkens indholdsstoffer kommer fra mælkekirtlens epithelceller, hvor udskillelsen kan foregå ad følgende veje: 1) over cellemembranen, 2) via fusion af vesikler dannet i Golgiapparatet, 3) via mælkefedtet og fedtkuglerne, 4) ved transcytose og 5) via de para-cellulære transportveje, som er af betydning for komponenter, som overføres fra blodet (Shennan and Peaker 2000).

Mælkeproteiner klassificeres i to hovedtyper: Kaseiner og valleproteiner. Kaseinerne repræsenterer i komælk ca. 80% af det totale protein og består af α_{s1} -, α_{s2} -, β - og κ -kasein. De mest fremherskende valleproteiner i komælk er α -lactalbumin og β -lactoglobulin, men der findes også en lang række øvrige proteiner og enzymer i vallen (Fox and Kelly 2012; Hui et al. 2006).

Kaseinerne indeholder en række modifikationer (fosforylering, glykosylering, disulfidbroer), som under ét kaldes for post-translationelle modifikationer (PTMer). Disse er, sammen med forekomsten af de forskellige genetiske varianter af mælkens fremherskende proteiner, med til at gøre mælkeproteinerne heterogene (Jensen et al. 2015; N.A. Poulsen et al. 2013; Nina Aagaard Poulsen and Larsen 2022). Alle kaseinerne er fosfor-proteiner grundet deres ester-fosfatgrupper knyttet til hydroxylgrupperne på aminosyrerne serin (Ser) og threonin (Thr) (Belitz, Grosch, and Schieberle 2008; Nina Aagaard Poulsen and Larsen 2022). Som følge heraf binder α_{s1} -, α_{s2} -, og β -kasein stærkt til divalente ioner som Ca^{2+} (Walstra, Wouters, and Geurts 2006). Derudover er κ -kasein glykolyseret i varierende grad hvad angår både antal og type af suktermolekyler. En stor del af mælkeproteinernes funktionalitet og interaktioner med andre mælkekomponenter, f.eks. micelledannelse, skyldes PTMerne (E. Bijl et al. 2014). Kaseinmiceller er sfæriske strukturer med en diameter på typisk 140-230 nm (De Kruif et al. 2012). De består af de fire kaseiner forbundet med calciumfosfat nanoclusters, som danner en makromolekylær struktur bestående af flere tusinde kaseiner (Dewan et al. 1974). Kaseinerne binder calciumfosfatsalte, hvor α_{s1} - og α_{s2} -kaseinerne danner de stærkeste bindinger,

da disse er de mest fosforylerede. Omkring 65% af mælkens totale calciumindhold er bundet til kasein-micellerne (Sandra et al. 2012). Fosforylering af kaseiner er katalyseret af kinase enzymer, som binder en fosfatgruppe til enten Ser eller Thr, i et Ser/Thr-XXX-Glu/pSer/Asp motiv, hvor XXX repræsenterer en hvilken som helst aminosyre. Glykosyleringerne på κ -kasein sker på Thr, og katalyseres af glycosyltransferase-enzymmer via O-glykosidbindinger, hvor enten mono-, di-, tri- eller tetrasaccharider vedhæftes (Etske Bijl, Holland, and Boland 2020).

Når mælk indtages, sker der en nedbrydning og fordøjelse af mælkeproteinerne til peptider. Her dannes blandt andet kaseinfosopeptider, som spiller en vigtig rolle for optagelse af calcium fra mælken (Clare and Swaisgood 2000). Proteinerne i mælk har en fordøjeligheds-korrigeret aminosyreværdi (protein digestibility-corrected amino acid score, PDCAAS) på over 1, hvilket er kriteriet for en meget god proteinkilde (Miller, McBean, and Jarvis 2006). Blandt valleproteinerne spiller α -lactalbumin en vigtig rolle for biosyntesen af laktose (Layman, Lönnerdal, and Fernstrom 2018), hvorimod b-lactoglobulin har egenskaben til at binde en lang række andre næringsstoffer, herunder lipider og vitaminer (Z. Teng, Xu, and Wang 2015). Blandt spædbørn, er β -lactoglobulin dog betragtet som et allergen, da det ikke findes i modermælk og kan give anledning til allergi blandt spædbørn (Chatterton et al. 2013).

Ud over mælkens mest fremherskende proteiner, som er nævnt ovenfor, er der i mælken en lang række komponenter, som findes i lavere mængder, omfattende fx metabolitter, enzymer, vækstfaktorer og andre bioaktive stoffer, som har biologiske funktioner, og som kan have betydning for mælkens holdbarhed, funktionalitet og sundhedsfremmende egenskaber. Mælkens komponenter kan variere med en lang række forhold (fodring, laktationsstadiet, race, somatisk celletal, produktionsformer) og er med til at give stor variation i mælkens sammensætning (Róin et al. 2023; Sundekilde, Larsen, and Bertram 2013; Tenori et al. 2018).

En større rapport er for relativt nyligt udarbejdet omkring variationer i sammensætning og egenskaber af mælk fra Dansk Holstein og Dansk Jersey (Nina Aagaard Poulsen and Larsen 2022).

2 Fermentering i fødevareproduktion

Fermentering til produktion af alternative proteiner kan deles op i tre forskellige kategorier, 1) biomassefermentering, 2) traditionel fermentering, og 3) præcisionsfermentering (Good Food Institute 2020).

2.1 Biomasse- og traditionel fermentering

Ved biomassefermentering udnyttes det høje proteinindhold og den hurtige vækst af mikroorganismer til effektivt at fremstille store mængder proteinrige fødevarer. Med denne tilgang udgør selve mikroorganismerne den alternative proteinkilde. F.eks. dyrkes filamentøse svampe som den primære ingrediens i Quorn mycoprotein, hvor biomassefermentering bruges til at fremstille et protein- og fiberrigt fødevarerprodukt, der bl.a. kan bruges som substitut for hakkekød i gryderetter og bøffer. Et andet eksempel er Solar Foods' dyrkning af gasfermenterende bakterier, der kan leve af hydrogen-ioner, CO₂ og mineraler, og ved filtrering og tørring af dyrkningsmediet opnås et pulver bestående af ~65-70% protein¹, som kan bruges som ingrediens i fødevarer. Modsat biomassefermentering, er det ved traditionel fermentering ikke mikroorganismernes protein-indhold, der er i fokus, men deres evne til at ændre en fødevare gennem fermentering. Brugen af mikrobielle kulturer til at konservere, fremstille alkoholiske drikke og forbedre ernæringsværdien og biotilgængeligheden af næringsstoffer har været kendt i årtusinder og er blevet anvendt i en bred vifte af fødevarer, der spænder fra f.eks. yoghurt til øl og sojaproduktet tempeh. Inden for alternativ proteinproduktion kan traditionel fermentering f. eks. anvendes til at forbedre smagen eller funktionaliteten af planteingredienser (T. S. Teng et al. 2021). For øjeblikket foregår der en del forskning og udvikling med henblik på at fremstille plantebaserede syrnede produkter, som ligner yoghurt, herunder afsøgning af kulturer, der egner sig til fremstilling af plantebaserede substrater så produktet opfylder ønsker til næringsindhold, tekstur, smag og øvrige sensoriske egenskaber (McNabb 2021).

2.2 Præcisionsfermentering

I forhold til produktion af mælk i køer forventes præcisionsfermentering at muliggøre produktion af højværdi fødevarerproteiner i mikrobielle cellefabrikker med potentiale for et lavere klimaaftryk, vand- og arealforbrug og en lavere udledning af miljøbelastende næringsstoffer. Ved præcisionsfermentering indsættes et eller flere ønskede gener i mikroorganismer, typisk bakterier, gær og filamentøse svampe (Chai et al. 2022; Hettinga and Bijl 2022; Williams 2021), som derefter producerer det/de ønskede protein(er). Proteiner, der produceres i en anden vært end deres oprindelige gennem genmanipulation kaldes rekombinante

¹ Derudover indeholder produktet 5-8% fedt (primært umættede), 10-15% kostfibre og 3-5% mineraler. <https://solar-foods.com/>

proteiner. Samme overordnede fremgangsmåde kan anvendes med værter, der ikke tilhører mikroorganismerne, men så kaldes det ikke præcisionsfermentering. Benyttes f.eks. planter, kaldes det molecular farming. I denne vidensyntese omtaler vi kun præcisionsfermentering.

I teorien kan enhver mikroorganisme anvendes, men valget er af afgørende betydning for ens produktion og tæt koblet med hvilket protein man ønsker udtrykt. Hver af de primært anvendte grupper af mikroorganismer har sine overordnede fordele og ulemper, men variationen inden for hver gruppe er samtidig enorm. Derudover er der stor forskel på, hvor meget vi ved om de enkelte arter og stammer, og kun en brøkdel af potentialet for rekombinant proteinproduktion i mikroorganismer er udforsket. Typisk tages der udgangspunkt i stammer, vi kender relativt godt, som er lette at arbejde med i laboratoriet og som allerede i nogen grad er blevet genetisk tilpasset til produktion af rekombinante proteiner. Selvom produktionsprocessen involverer brugen af genetisk modificerede organismer (GMO) vil det oprensede produkt typisk være fri for GMO-organismer (Williams 2021). Teknologien er velkendt fra medicinalindustrien til produktion af f.eks. insulin, men også fra fødevarerområdet til produktion af f.eks. specifikke vitaminer, pigmenter, proteiner og fødevarerenzym. Et eksempel på dette er osteløbe, der er baseret på kalveenzymet chymosin, og som i en lang årrække har været produceret af virksomheden Novonesis (tidl. Chr. Hansen).

Produktion af fødevarerproteiner, som f.eks. mælke- eller ægprotein i stor skala via præcisionsfermentering er bl.a. motiveret af en rapport fra tænketanken RethinkX, som forudser udfasning af traditionel mælkeproduktion i 2030 (Tubb and Seba 2021). I rapporten er der fremført en række scenarier, hvor fødevarerprotein fremstillet via præcisionsfermentering overtager det animalske område indenfor kød, mælk og æg. Her anvendes de producerede proteiner både til fremstilling af fødevarer, der skal ligne traditionelle animalske fødevarer og som ingredienser i nye fødevarerprodukter. Proteinerne i disse fødevarer kan både stamme udelukkende fra præcisionsfermentering og være hybridprodukter bestående af et mix af mikrobielle, animalske og planteproteiner. I denne sammenhæng er de animalske proteiner eftertragtet grundet deres gode ernæringsmæssige og funktionelle egenskaber.

Præcisionsfermenteringsområdet er i dag præget af internationale startupvirksomheder (Tabel 1), som ofte har meget store investeringer i ryggen, og som potentielt kan *disrupte* dele af den danske fødevarerproduktion. Den indsigt har medført, at store eksisterende mejerivirksomheder ligeledes foretager investeringer og indgår partnerskaber inden for dette område. Bl.a. har Nestle og Friesland-Campina annonceret, at de vil investere i præcisionsfermenterede eller *ko-frie* mælkeproteiner. Derudover har Perfect Day allerede lanceret et mælkeprodukt, hvor de anvender rekombinant β -lactoglobulin og General Mills sælger friskost fremstillet ved brug af Remilks rekombinante β -lactoglobulin frem for komælk. Her i Danmark har Arla Food Ingredients og Novozymes annonceret et partnerskab på området.

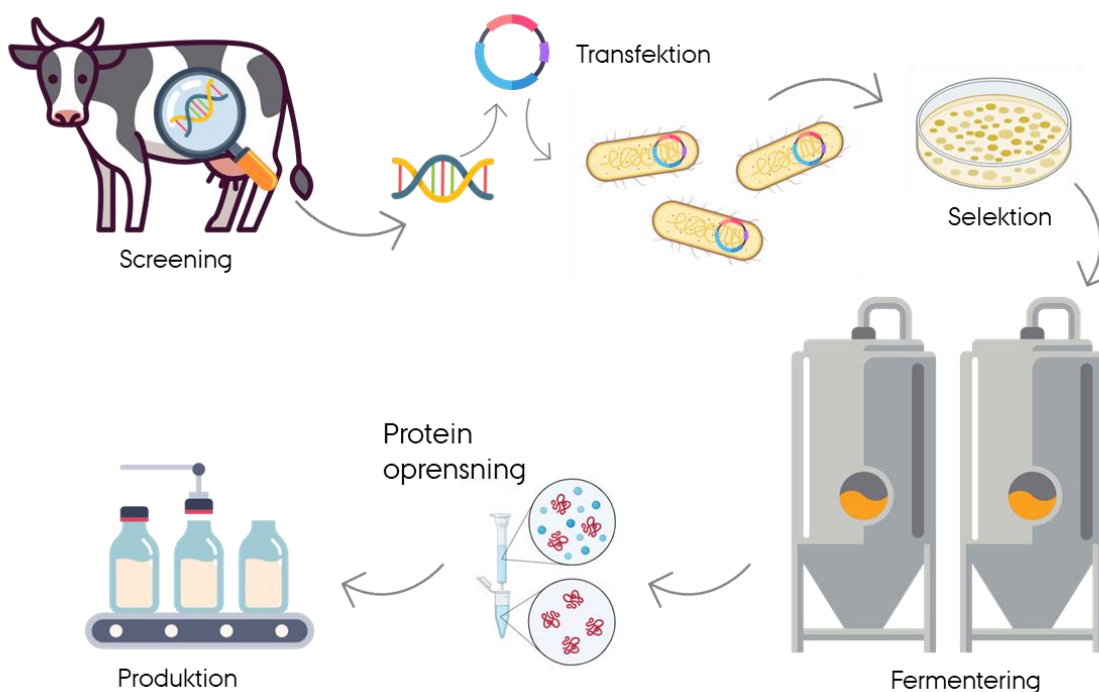
Tabel 1. Liste over udvalgte virksomheder, som gør brug af præcisionsfermentering.

	<u>Virksomhed</u>	<u>Target gen</u>	<u>Strategi</u>	<u>Produkt</u>	<u>Land</u>
	<u>Perfect day</u> ¹	<u>β-lactoglobulin (på markedet)</u> <u>Øvrige mælkeproteiner</u>	<u>Svampe, gær</u>	<u>Mejeriprodukter</u>	<u>USA</u>
	<u>Clara food</u> ²	<u>Albumin</u> <u>Pepsin</u>	<u>Gær</u>	<u>Ægprotein</u> <u>Enzym</u>	<u>USA</u>
	<u>Conagen</u> ³	<u>Rebaudiosider</u> <u>Flavonoider</u> <u>Lipider</u> <u>Aminosyrer</u>	<u>Gær, bakterier</u>	<u>Sødestoffer</u> <u>Vitaminer og kosttilskud</u>	<u>USA</u>
	<u>These Vegan Cowboys</u> ⁴	<u>Mælkeproteiner</u>	<u>Svampe</u>	<u>Mejeriprodukter</u>	<u>Belgien</u>
	<u>Geltor</u> ⁵	<u>Kollagen</u>	<u>Gær, bakterier</u>	<u>Gelatine</u>	<u>USA</u>
	<u>Bond Pet Foods</u> ⁶	<u>Muskel-gen fra kylling</u>	<u>Gær</u>	<u>Hundemad</u>	<u>USA</u>
	<u>New culture</u> ⁷	<u>Kaseiner</u>	<u>Gær, bakterier, svampe</u>	<u>Mejeriprodukter</u>	<u>USA</u>
	<u>Remilk</u> ⁸	<u>Mælkeproteiner</u>	<u>Gær</u>	<u>Mejeriprodukter</u>	<u>Israel</u>
	<u>Nutropy</u> ⁹	<u>Mælkeproteiner</u>	<u>Gær</u>	<u>Ost</u>	<u>Frankrig</u>
	<u>Real deal milk</u> ¹⁰	<u>Kaseiner og val-leproteiner</u>	<u>Gær</u>	<u>Mejeriprodukter</u>	<u>Spanien</u>
	<u>TurtleTree</u> ¹¹	<u>Laktoferrin</u>	<u>Gær</u>	<u>Mejeriprodukter</u>	<u>Singapore</u> <u>USA</u>

¹<https://perfectday.com/>; (Terefe 2022), ²<https://theeverycompany.com>, ³<https://conagen.com/markets-we-serve/specialty-industrial-chemicals/>; <https://conagen.com/press-item/conagen-successfully-develops-antioxidant-kaempferol-by-precision-fermentation>, ⁴<https://thosevegancowboys.com>, ⁵<https://geltor.com>; (Elaine Watson 2022; Terefe 2022), ⁶<https://www.bondpets.com/our-mission>, ⁷<https://www.newculture.com>, ⁸<https://www.remilk.com>, ⁹<https://nutropy.com>, ¹⁰<https://www.realdealmilk.com/how>, ¹¹<https://www.turtletree.com>

2.3 Produktionsprocessen

Første trin i præcisionsfermentering involverer valg af protein og dermed det gen, der skal udtrykke proteinet (for eksempel genet kodende for en af mælkenes kaseiner), se figur 1. Næste trin er indsættelse af genet i en værtsspecifik vektor som overføres til værtsorganismen, der herefter kan udtrykke genet (Williams 2021). For at øge produktionen af det ønskede protein indsættes typisk mange kopier af det kodende gen. Efter selektion af celler med det udtrykte gen flyttes cellerne til en fermenteringstank, hvor selve proteinproduktionen foregår. Herefter skal de rekombinante proteiner ekstraheres og oprenses. Dette gøres lettest hvis proteinerne er blevet udskilt af værtsorganismen, så værtscellerne ikke skal lyses. I nogle tilfælde kan produktionen optimeres til en sådan grad, at oprensning via filtrering er tilstrækkeligt (Oliveira and Domingues 2018; Pringels et al. 2018). Oftest er en mere teknisk oprensning nødvendig, fx ved affinitetskromatografi og størrelseskromatografi (gel filtrering), og renheden af proteinet skal altid undersøges ved protein-kemiske teknikker (Le, Deeth, and Larsen 2017).



Figur 1: Overordnede trin i forbindelse med præcisionsfermentering. Lavet ved hjælp af BioRender og FlatIcon.

Hvis rekombinante kaseiner skal bruges til fremstilling af ost og andre mejeriprodukter ved brug af traditionelle metoder for komælk og med samme forventede resultat, er det afgørende at kaseinerne samles i kaseinmiceller. Her tilføjes calcium og fosfat typisk i kombination med andre ioner til en vanding opløsning

med de rekombinante proteiner. Dette er dog ikke en trivial proces, og udfordringerne hermed vil blive behandlet nærmere i afsnit 2.5.

2.4 Produktion af mælkeproteiner

I denne sektion ser vi nærmere på de videnskabelige artikler, der rapporterer udtryk af rekombinante mælkeproteiner i mikroorganismer. En liste over udgivelserne, der både dækker bovine og humane mælkeproteiner, findes i tabel 2.

Udtryk af rekombinante bovine mælkeproteiner i mikroorganismer blev skudt i gang i 1988, hvor Kang og Richardson lykkedes med at udtrykke κ -kasein i *E. coli* (Kang and Richardson 1988) og Nagaos gruppe lykkedes med at udtrykke α_{S1} -kasein i *E. coli* (Nagao et al. 1988). Et år senere blev det vist hvorledes bovint α -laktalbumin kan udtrykkes i *E. coli* (Wang et al., 1989) og i 1990 blev β -kasein og β -laktoglobulin udtrykt i hhv. *S. cerevisiae* og *E. coli* (Batt et al. 1990; Jimenez-Flores, Richardson, and Bisson 1990). Kort efter blev det vist, at mælkeproteinernes primærstruktur kan modificeres, da tre methionin-aminosyrer blev tilføjet til bovint κ -kasein inden det blev udtrykt i *E. coli* for at øge proteinets ernæringsmæssige værdi (Oh 1990).

Af de to primære valleproteiner og de fire kaseiner i komælk, er det således kun α_{S2} -kasein, der ikke er rapporteret udtrykt som et rekombinant protein i forskningslitteraturen. Rekombinant bovint α_{S2} -kasein er dog kommercielt tilgængeligt produceret i såvel *E. coli* som gær (<http://cusabio.com> & www.mybio-source.com), og patenter tilhørende Perfect Day, New Culture m.fl. rapporterer produktionen af rekombinant bovint α_{S2} -kasein sammen med de andre tre kaseiner (Beauchamp et al. 2019; Gibson, Radman, and Abo 2023). Det er værd at bemærke, at patentet tilhørende Perfect Day primært beskriver brugen af gær og filamentøse svampe som værtsorganismer, hvorimod patentet tilhørende New Culture primært beskriver brugen af forskellige gram-positive bakterier som værtsorganismer tilhørende slægter som *Bacillus*, *Lactococcus*, og *Lactobacillus*, hvilket muliggør sekretion af de rekombinante proteiner til vækstmediet. Det er dog kun *Bacillus*, der kan respirere aerobt, hvorfor det må formodes, at denne er den primære vært for ekspression af rekombinante proteiner. Med undtagelse af α_{S2} -kasein er alle fire bovine kaseiner og de to primære bovine valleproteiner rapporteret udtrykt i *E. coli* i forskningslitteraturen (Kang and Richardson 1988; Nagao et al. 1988; Simons et al. 1993). I gær gælder dette kun for bovint β -kasein samt de to primære bovine valleproteiner, hvis man ser bort fra kommercielle kilder (Choi and Jiménez-Flores 2001; Jimenez-Flores, Richardson, and Bisson 1990). Ingen af de bovine kaseiner er rapporteret udtrykt i filamentøse svampe, men effektiv produktion af valleproteinet β -laktoglobulin er blevet rapporteret udtrykt i *Trichoderma reesei* i 2023 (Aro et al. 2023), og denne filamentøse svamp er samtidig den foretrukne vært til produktion af β -laktoglobulin i stor skala i Perfect Days kommercielle produktion.

Blandt de primære humane mælkeproteiner er det kun κ -kasein, som ikke er rapporteret udtrykt mikrobielt i forskningslitteraturen. Brugen af værtsorganismer udgøres af de samme overordnede grupper, som benyttes til produktionen af de bovine mælkeproteiner. Antallet af eksempler fra forskningsartikler er dog en smule mindre og fordelingen af resultater på tværs af organismer mere ujævn. Eksempelvis er det humane valleprotein α -laktalbumin kun rapporteret udtrykt i *Komagataella phaffii* (Deng et al. 2022), imens det humane valleprotein laktoferrin er rapporteret udtrykt i tre forskellige stammer af filamentøse svampe: *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus oryzae* og *Aspergillus awamori* (P. P. Ward et al. 1997; P. P. Ward, Lo, et al. 1992; P. P. Ward, May, et al. 1992). For udtryk af rekombinante humane mælkeproteiner er det kommercielle sigte primært som brug i modernælkserstatning.

Tabel 2: Liste over rapporterede studier, hvor forskellige mikroorganismer har været brugt som vært til produktion af de primære bovine og humane mælkeproteiner.

Protein	Værtsorganisme	Primære resultater	Reference
Bovine mælkeproteiner			
Bovint α_{s1}-kasein	<i>Escherichia coli</i> C600 & JM103	Ekspression af α_{s1} -kasein i <i>E. coli</i> C600 og JM103. Oprensning efter lysering af cellerne.	(Nagao et al. 1988)
	<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	Ekspression af bovin α_{s1} -kasein i <i>E. coli</i> både som nativ homolog og i modificeret version, hvor Phe er fraværende tiltænkt patienter med Phenylketonuri.	(Goda et al. 2000)
	<i>Lactococcus. Lactis</i>	Ekspression af GFP-fusioneret α_{s1} -kasein i <i>L. lactis</i> . Oprensning ved lysering af cellerne.	(Shigemori et al. 2012)
Bovint α_{s2}-kasein	<i>Escherichia coli</i> / yeast	Ikke rapporteret i videnskabelige artikler, men kan købes online: https://www.cusabio.com/ & https://www.mybiosource.com/	-
Bovint κ-kasein	<i>Escherichia coli</i> RR1 and JM105	Ekspression af bovin κ -kasein ved kloning af cDNA i <i>E. coli</i> under kontrol af <i>trc</i> og <i>lac</i> promotorer.	(Kang and Richardson 1988)
	<i>Escherichia coli</i> AR68	Ekspression af modificeret bovin κ -kasein i <i>E. coli</i> , hvor tre methionin-aminosyrer var tilføjet for at øge proteinets ernæringsmæssige værdi.	(Oh 1990)
Bovint β-kasein	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (AB116)	Ekspression af β -kasein i <i>S. cerevisiae</i> . Oprensning ved lysering af cellerne.	(Jimenez-Flores, Richardson, and Bisson 1990)

	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	Ekspression af β -kasein i <i>E. coli</i> , hvor lysning af cellerne undgås i oprensningen ved i stedet at fraktionere den ydre cellevæg, hvilket frigiver proteiner i periplasma.	(Simons et al. 1993)
	<i>Komagataella phaffii</i> (formerly <i>Pichia pastoris</i>)	Ekspression af β -kasein i <i>K. phaffii</i> , med mutationerne Leu ₇₀ --> Ser ₇₀ og Leu ₇₀ -Pro ₇₁ --> Ser ₇₀ -Ser ₇₁ . Sidstnævnte ledte til glykolysering af Asn ₆₈ .	(Choi and Jiménez-Flores 1996)
	<i>Komagataella phaffii</i>	Ekspression af β -kasein i <i>K. phaffii</i> , hvor 30% af proteinerne er glykosyleret med mannose på Asn ₆₈ . Fosforyleringsgrad svarer til bovint β -kasein.	(Choi and Jiménez-Flores 2001)
Bovint β-laktoglobulin (β-lg)	<i>Escherichia coli</i> TG1	Ekspression af β -lg i <i>E. coli</i> , omend med en struktur afvigende fra den native og i en uopløselig form grundet manglende disulfidbroer.	(Batt et al. 1990)
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ekspression af β -lg i gærstammen <i>S. cerevisiae</i> .	(Totsuka et al. 1990)
	<i>Komagataella phaffii</i>	Ekspression af et modificeret bovint β -lg i <i>K. phaffii</i> , hvor tre glycosyleringssites er indsat for at efterligne glykosyleringsmønstret i humant glycodelin (homolog af β -lg).	(Kalidas, Joshi, and Batt 2001)
	<i>Lactococcus Lactis</i> NZ9000	Ekspression af β -lg i <i>L. lactis</i> under kontrol af det nisin-inducerbare ekspressionssystem og med signal peptide Usp45 fusioneret til N-terminus.	(Chatel et al. 2001)
	<i>Lactobacillus casei</i> BL23	Ekspression af β -lg i <i>L. casei</i> under kontrol af det nisin-inducerbare ekspressionssystem og med signal peptide Usp45 fusioneret til N-terminus.	(Hazebrouck et al. 2007)
	<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	Ekspression af β -Lg med disulfid-broer i en prokaryot ved co-ekspression af cytoplasmatisk isomerase. Methionin ved N-terminus var ikke kløvet.	(Ponniah et al. 2010)
	<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	Ekspression af β -lg i <i>E. coli</i> som i Ponniah et al. (2010), men med indførsel af mutationerne L1A/I2S, der sikrer kløvning af methionin i N-terminusen.	(Loch et al. 2016)
	<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	Ekspression af β -Lg i <i>E. coli</i> med og uden mutationerne L1A/I2S. Deres fysisk-kemiske egenskaber var meget sammenlignelige med nativ β -lg.	(Keppler et al. 2021)
	<i>Trichoderma reesei</i> M1908	Ekspression af β -lg i <i>T. reesei</i> . Samme sekundære struktur og emulgerende egenskaber som det native protein. Enkelte mannose-molekyler på proteinet.	(Aro et al. 2023)

Bovint α-laktalbumin	<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	Ekspression af bovin α -laktalbumin fusioneret med fragment af humant cathepsin D i <i>E. coli</i> . S-S broer etableret <i>in vitro</i> efter oprensning.	(Wang et al. 1989)
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ekspression og sekretion af bovin α -laktalbumin fusioneret til preproregion af α -mating factor i <i>S. cerevisiae</i> .	(Viaene et al. 1991)
Bovint laktoferrin	<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	Ekspression af bovin laktoferrin fusioneret med thioredoxin i <i>E. coli</i> .	(García-Montoya et al. 2013)
	<i>Komagataella phaffii</i> KM71-H	Ekspression af bovin laktoferrin i <i>K. phaffii</i> under AOX1 promotor kontrol. Oprenset udbytte på 3,5 g/L.	(Iglesias-Figueroa et al. 2016)
	<i>Bacillus subtilis</i> 168	Ekspression af laktoferrin 'N-lobe' i <i>B. subtilis</i> under P_{veg} promotor kontrol. Oprenset udbytte på 16.5 mg/L.	(Jin et al. 2019)
	<i>Bacillus subtilis</i> 168	Ekspression af laktoferrin 'C-lobe' i <i>B. subtilis</i> under P_{veg} promotor kontrol. Oprenset udbytte på 7.5 mg/L.	(Jin et al. 2022)

Humane mælkeproteiner

Humant α_{s1}-kasein	<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	Ekspression af humant α_{s1} -kasein i <i>E. coli</i> . Oprenset udbytte udgjorde 25% af total proteinmængde i cellen. Dog var methionin i N-terminus ukløvet.	(Kim et al., 1997)
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ekspression af humant α_{s1} -kasein i gærstammen <i>S. cerevisiae</i> .	(Y.-K. Kim et al. 1999)
Humant β-kasein	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	Ekspression af humant β -kasein i <i>E. coli</i> .	(Hansson et al. 1993)
	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	Ekspression af fosforyleret humant β -kasein ved co-ekspression med human kasein kinase II.	(Thurmond et al. 1997)
Humant κ-kasein	-	Ingen rapporterede	-
Humant α-laktalbumin	<i>Komagataella phaffii</i>	Ekspression og sekretion af humant α -laktalbumin i <i>K. phaffii</i> under AOX1 promotor kontrol og co-ekspression med humant disulfidisomerase A3.	(Deng et al. 2022)

Humant laktoferrin	<i>Aspergillus nidulans</i>	Ekspression og sekretion af humant laktoferrin i <i>Aspergillus nidulans</i> under kontrol af <i>alcA</i> promoter.	(P. P. Ward, May, et al. 1992)
	<i>Aspergillus oryzae</i>	Ekspression og sekretion af humant laktoferrin i <i>Aspergillus oryzae</i> under kontrol af <i>A. oryzae</i> α -amylase promoter.	(Ward, Lo, et al., 1992)
	<i>Aspergillus awamori</i>	Ekspression og sekretion af humant laktoferrin som glucoamylase fusionsprotein i <i>A. awamori</i> . Proteinet blev modnet ved Kex-2 peptidase kløvning <i>in vivo</i> .	(P. P. Ward et al. 1997)

Undersøgelser af kemiske og funktionelle egenskaber af rekombinant β -lactoglobulin syntetiseret af *E. coli* (Keppler et al. 2021) viste, at rekombinant β -lactoglobulin med høj renhed, men uden PTMer, til en vis grad havde en funktionalitet lignende den native bovine β -lactoglobulin. Funktionaliteten af kasein-proteinerne afhænger imidlertid af deres evne til at danne kasein-miceller, og den videnskabelige konsensus er, at fraværet af PTMer på de bovine kaseiner forhindrer korrekt micelledannelse, hvilket resulterer i en mineralbinding og funktionalitet, der afviger fra den vi kender fra komælk (Antuma et al. 2023).

Ved produktion af proteiner i gærceller og svampe ses typisk PTMer, der minder om dem vi kender fra køer i type og niveau, da de har et eukaryotisk synteseapparat. Samtidig er det ofte brugen af gærceller og svampe, som giver det højeste udbytte (Chai et al. 2022; Mapelli-Brahm et al. 2020). Ved brug af gærceller kan der dog også dannes PTMer, som ikke ses i det oprindelige protein, eksempelvis en øget mannosylering eller fosforylering på andre positioner end i det native protein (Hettinga and Bijl 2022; Kalidas, Joshi, and Batt 2001; O. P. Ward 2012). I et studie af Choi and Jimenez-Flores (2001), blev bovint β -kasein udtrykt i gærorganismen *Komagataella phaffii* (tidl. *Pichia Pastoris*), hvor fosforyleringsgraden svarede til den for β -kasein i komælk (Choi and Jiménez-Flores 2001). I dette studie illustreredes også gærcellers egenskaber til glykolysering ved udskiftning af to aminosyrer (L70S/P71S), hvilket ledte til en Asn₆₈-vedhæftet glykan på 30% af det udtrykte β -kasein, som ikke findes på β -kasein i komælk. Udover en høj grad af fosforylering kan *K. Phaffii* manipuleres til at udskille rekombinante proteiner. Samtidigt har den en begrænset produktion af egne sekretionsproteiner, hvilket gør oprensning af det rekombinante protein markant lettere (Karbalaee, Rezaee, and Farsiani 2020).

Mange stammer af gær og filamentøse svampe udskiller naturligt store mængder protein, f.eks. enzymer til ekstracellulær nedbrydning. Dette er en eftertragtet egenskab, da rekombinante proteiner er meget lettere at oprense, hvis de er udskilt til dyrkningsmediet frem for at blive ophobet intracellulært. De gram-negative

bakterier egner sig ikke til effektiv sekretion af rekombinant protein med deres dobbeltmembran, men gram-positive bakterier har kun en enkelt membran og en mere simple mekanisme til sekretion og kan derfor manipuleres til at udskille rekombinante proteiner.

Det skal nævnes, at hovedparten af studierne hidtil er udført med det formål at optimere og undersøge selve bakterierne, svampene og gærcellerne som ekspressionssystemer. Formålet i de tidlige studier har altså ikke været med fokus på at optimere udbytte, funktionalitet eller anvendelse af de udtrykte proteiner i fødevarer.

2.5 Udfordringer

Dannelsen af kaseinmiceller fra rekombinante kaseiner udgør en af de største udfordringer mht. kaseineres videre anvendelse i fødevarer (Hettinga and Bijl 2022). I denne sammenhæng er manglen på PTMer eller ændringer i deres type og placering på rekombinante kaseiner en central hæmsko, da det medfører, at proteinernes fysisk-kemiske egenskaber, ernæringsværdi og funktionalitet ændres (Hettinga and Bijl 2022; Che et al., 2025). For eksempel vil ændret proteinfoldning potentielt have effekt på opløselighed eller mineralbinding, hvilket påvirker kaseinernes egenskaber til at danne kaseinmiceller (Liu et al. 2016; Lucey and Horne 2018).

Derfor arbejdes der også med at modificere diverse værtsceller, så de bliver i stand til at efterligne de animalske PTMer på f.eks. mælkeprotein. En løsning på manglende PTMer i bakterier kan være at co-udtrykke det PTM-ansvarlige enzym sammen med proteinet. Generne til disse enzymer kan både tages fra samme organisme som target-genet, men kan også udvælges fra en hvilken som helst anden organisme alt efter hvad værtsorganismen tillader (Clegg and Holt 2009).

Bakterier har et andet synteseapparat til PTMer end eukaryoter og man finder generelt færre PTMer i proteiner fra bakterier sammenlignet med eukaryoter. Derudover kan de samme typer af PTMer findes på andre positioner, og der kan findes andre typer af PTMer end dem, vi ser i eukaryoter. Resultatet er, at rekombinante proteiner udtrykt i bakterier typisk ikke vil bære de PTMer vi ser på det native protein. Dette medfører, at funktionalitet af de rekombinante mælkeproteiner afviger fra den funktionalitet, vi observerer, når proteinet er udtrykt af animalske celler (Antuma et al. 2023). Disse kan introduceres *in vitro* ved tilsætning af kinase-enzym eller *in vivo* ved at co-udtrykke kinaser i cellen. Sidstnævnte strategi blev anvendt til at udtrykke humant β -kasein i *E. coli* ved co-udtryk af human kasein kinase II, hvilket ledte til fosforylering af det rekombinante protein (Thurmond et al. 1997).

Der er dog noget vej endnu, før vi effektivt kan producere rekombinante kaseiner med PTMer der efterligner dem vi ser i deres oprindelige værter fuldstændigt. Derfor har private selskaber søgt at skabe forsimplede

kaseinmiceller af rekombinante kaseiner, som fortsat opnår en funktionalitet, der egner sig til produktion af diverse mælkeprodukter. Det tidligere nævnte patent tilhørende Perfect Day dækker eksempelvis fremstilling af kaseinmiceller kun bestående af rekombinant β - og κ -kasein, hvorimod patentet tilhørende New Culture dækker fremstilling af kaseinmiceller kun bestående af rekombinant α - og κ -kasein (Beauchamp et al. 2019; Gibson, Radman, and Abo 2023).

Med den nuværende præcisionsfermenteringsteknologi udtrykkes typisk ét rekombinant protein per produktionsstamme og produktet fra fermenteringen af en enkelt mikroorganisme bliver dermed ikke den komplekse blanding af diverse komponenter og næringsstoffer, som findes i mælk (Williams 2021). Undtagelsesvist har New Culture udviklet en bakterie, der er i stand til at udtrykke både α - og κ -kasein og udskille disse til det omgivne medium. Bakterien dyrkes i et serum, som fordrer dannelse af kaseinmiceller ud fra disse to mælkeproteiner, så snart de er udskilt fra cellen. Bakterierne bliver herefter adskilt fra serum ved filtrering, proteinmængden opkoncentreres ved centrifugering og herefter benyttes serum til produktion af mejeriprodukter uden videre raffinering (Gibson, Radman, and Abo 2023). Mælk indeholder dog mange hundrede forskellige komponenter, heraf mange bioaktive stoffer, og det er ikke forventningen, at præcisionsfermentering kan bruges til at fremstille en komplet efterligning af den naturlige mælk, men derimod, at prioritere de specifikke komponenter, der er vigtigst for funktionaliteten, næringsværdien og de sundhedsfremmende kvaliteter.

Udbyttet kan også være en begrænsende faktor (Vestergaard, Chan, and Jensen 2016), og for *K. phaffii* bliver vækstcyklus specifikt nævnt som en mulig begrænsende faktor ved produktion af rekombinante proteiner (Heyland, Blank, and Schmid 2011). Derfor er det vigtigt at vælge det rette næringsmedium for organismerne, og at sørge for at strømline værtsorganismens synteseveje imod maksimal produktion af det rekombinante protein (Lovmar and Ehrenberg 2006). En stor del af udbyttet kan også gå tabt i oprensningsprocessen. Dette gælder især, hvis det rekombinante protein ikke udskilles af cellen, da det nødvendiggør lysering af cellen efterfulgt af en avanceret oprensning fra et meget heterogent medium. Derfor foretrækkes mikroorganismer, der kan udskille det rekombinante protein, hvilket gør oprensning fra et meget simpelt medium muligt. Oprensningsprocessen kan yderligere effektiviseres ved inkorporering af et såkaldt HIS-tag i det rekombinante protein. Et His-tag består af seks til ni histidin-aminosyrer, som binder stærkt til metal-ioner. Efter at det rekombinante protein er 'fisket' ud af mediet ved at lade det passere gennem en kolonne belagt med metal-ioner, kløves HIS-tag'et med et specifikt enzym *in vitro* (Y. K. Kim et al. 1997), så det ikke findes i det færdige produkt.

Udbyttet hænger unægtelig sammen med produktionsomkostningerne, hvilket også udgør en væsentlig udfordring ved produktion af rekombinante proteiner til fødevarer, som skal kunne produceres relativt billigt

for at kunne kommercialiseres (Takefuji 2021). Fremstillingen af deciderede fødevarerproteiner ved præcisionsfermentering er stadig relativt nyt, og vi ved endnu ikke hvor stor en effektiviseringsgevinst, der gemmer sig i videreudvikling og opskalering af teknologien. Derfor er det endnu uklart om produktionen vil være økonomisk bæredygtig (Good Food Institute 2020; Terefe 2022). Fremtidige afgifter på eksternaliteter som CO₂ kan vise sig at være en vigtig faktor i denne afgørelse.

Intracellulær ophobning af rekombinante mælkeproteiner er ofte en udfordring, og gør sig gældende i mange af de artikler, der findes i tabel 2. Dette gælder især med *E. coli* som vært og særdeles hvis proteinerne indeholder svulvbroer. Det skal dog tilføjes, at *E. coli* ikke anses for at være den endelige vært i produktion i stor skala, men blot bruges som eksperimentel trædesten på vej mod anvendelse af organismer, der er bedre egnede til produktion i stor skala. Som værtsorganismer i stor skala går man efter mikroorganismer, der er i stand til at udskille proteiner, dvs. gram-positive bakterier, gær eller filamentøse svampe. Intracellulær ophobning af rekombinante proteiner ses dog også uden for *E. coli*, eksempelvis i gær, hvor rekombinante proteiner kan samles i vakuoler, hvilket tilmed kan medføre proteinnedbrydning (Hettinga and Bijl 2022; O. P. Ward 2012). Intracellulær ophobning af rekombinante proteiner skyldes fejlagtig foldning, som leder til eksponering af hydrofobe regioner, som deraf fordrer sammenklumpning af misdannede proteiner. Co-ekspression af chaperone-proteiner (hjælper med korrekt foldning), isomeraser (hjælper med dannelselse af disulfid-broer og genfoldning af proteiner med disulfid-broer, der ikke er blevet rigtigt foldet) og kinaser (kan phosphorylere proteiner, hvilket kan have betydning for dets foldning og opløselighed) har vist sig at være effektive redskaber til at reducere mængden af intracellulært ophobede rekombinante proteiner (Deng et al. 2022; Ponniah et al. 2010; Thurmond et al. 1997).

Ved ekspression af eukaryote gener som mælkeproteiner i prokaryoter mangler kløvning af N-terminus signal peptid ofte. Det kan løses ved enzymatisk kløvning *in vitro*, men det er også vist at introduktion af bestemte mutationer i denne sekvens kan muliggøre kløvning *in vivo*, hvilket blev vist ved ekspression af bovint β -laktoglobulin i *E. coli* med mutationen L1A/I2S, som sikrede den ønskede kløvning (Loch et al. 2016).

Brugen af GMO er stadig meget kontroversiel, når det kommer til forbrugere (T. S. Teng et al. 2021). Der er desuden behov for en erhvervsmæssig konsensus omkring nomenklatur og definition af de nye produkter, samt forbrugeroplysning og -accept. Præcisionsfermentering kan opfattes som en kunstig proces, da det involverer biologisk syntese af GMO, men korrekt adskillelse af den genmanipulerede værtsorganisme og det rekombinante protein resulterer i et rent produkt uden GMO-rester. Lovgivningen af GMO indenfor fødevarer varierer på tværs af lande og regioner, hvilket komplicerer udviklingen af ensrettede retningslinjer og regulativer (Chai et al. 2022; Mallapaty 2019; Mertens et al. 2019; Van Wyk et al. 2020). For eksempel gælder GMO-mærkningen ikke naturækvivalente molekyler fremstillet af præcisionsfermentering i nogle

lande som USA og Australien. Hvis ikke der holdes styr på sådanne forskelle, så nomenklatur m.v. er tilpasset til det enkelte land, kan forskellene danne grobund for mistillid til produkterne fra nogle forbrugere (Terefe 2022).

Retningslinjerne for økologisk produktion omfatter et forbud mod brugen af GMO, hvorfor brugen af rekombinante proteiner i fødevarer er uforenelig med økologisk produktion. Derimod vil proteinerne, hvis de adskilles fra GMO-organismerne inden de anvendes, kunne deklareres som veganske.

Fødevarer sikkerheden omkring produkter fremstillet ved præcisionsfermentering er, som for alle øvrige fødevarer, essentiel. Dette gælder især kontrol af kontaminering med patogene mikrober, som kan optræde i fermenteringstanken og producere skadelige metabolitter, som ikke nødvendigvis frasorteres i den efterfølgende oprensning. Derfor er en streng risikovurdering af slutprodukterne afgørende før et produkt bringes på markedet (T. S. Teng et al. 2021). Især i EU er der lang vej før disse produkter opnår godkendelse, da de skal igennem godkendelse som Novel Food (European Union 2018). Dette bliver sandsynligvis den største flaskehals i forhold til at få produkterne på det europæiske marked.

På trods af potentielt store fordele mht. forbedring af klimaaftryk, næringsstofudledning, afskovning, antibiotikabrug, dyrevelfærd, sygdomme koblet til dyrehold, og landareal for fremstilling af proteiner til fødevarer ved præcisionsfermentering, er der fortsat udfordringer, der skal løses før disse fødevarer kan udbredes kommercielt i stor skala.

2.5 Fremtidsperspektiver

I takt med, at interessen for fødevarerproteiner fremstillet ved bioteknologi stiger, forventes det også at antallet af nye startupvirksomheder indenfor præcisionsfermentering vil stige. Tabel 1 viser en liste over forskellige start-ups indenfor området. Der var ni nye start-ups indenfor præcisionsfermentering i 2020 (Terefe 2022).

Indenfor alternativ kødproduktion har præcisionsfermentering været brugt til at skabe the Impossible Burger, hvor genet for leghæmoglobin proteinet fra soyabønner blev klonet ind i gærceller og efter oprensning tilsat en plantebøf for at øge smag og udseende i det alternative kødprodukt (Impossible Foods 2020; Williams 2021).

Hvor man i år 2000 kunne producere rekombinant protein til en pris på 1 mio \$ pr kg kunne man i 2019 gøre det for 100 \$ pr kg (Tubb and Seba 2021). Ifølge forfatterne kan det forventes at omkostningerne til proteinproduktion ved præcisionsfermentering fortsat vil falde frem mod 2025, hvor prisen forventes at være 10 \$ pr kg, og i 2030 forudses det, at produkterne vil være halvt så dyre som kød- og mejeriprodukter.

Der har dog vist sig at være store udfordringer især mht. effektivitet og opskalering, hvorfor det er et af de primære fokusområder i den kommercielle sektor. Lige nu genererer en såkaldt "large"-scale præcisionsfermentering fra gram til få kg per batch. I 2019 var den største fermenteringstank brugt til syntese af enzymer ved brug af præcisionsfermentering på omkring 5000 liter (Tubb and Seba 2021), og manglen på infrastruktur til fermentering samt den nødvendige viden om hvorledes en fermenteringsprocess tilpasses til større skala er fortsat en flaskehals i udviklingen.

3 Fremstilling af mælkebestanddele i kultiverede yverceller

Udover præcisionsfermentering er kultiveret mælk, hvor mælkebestanddele fremstilles i kultiverede yverepithelceller, en mulig fremtidig strategi for produktion af mælkekomponenter. Ved præcisionsfermentering anvendes gensekvenser af specifikke mælkeproteiner og dermed ikke egentligt væv fra koen. Ved fremstilling af kultiveret mælk anvendes derimod yverepithelceller, som kræver, at der isoleres celler fra yvervævet fra en ko eller celler direkte fra mælken, hvor der naturligt findes et mindre antal epithelceller (Takefuji 2021). Denne metode er beslægtet med metoden for fremstilling af kultiveret kød, hvor muskelceller (såkaldte satelitceller) udtages fra specifikke dyr og dyrkes i laboratoriet. Teknologien for fremstilling af kultiveret kød er dog betydeligt længere fremme end for kultiveret mælk, og kultiverede kødprodukter er i langt højere grad tættere på markedet i en række lande. Ved fremstilling af kultiveret mælk dyrkes og differentieres cellerne før høstning af de udskilte mælkekomponenter. Området er, ligesom præcisionsfermentering til produktion af mælkeproteiner, præget af en række internationale startupvirksomheder (Tabel 3).

Tabel 3: Liste over forskellige virksomheder indenfor området kultivering af mælkekirtelceller til produktion af mælkebestanddele.

	Virksomhed	Celler	Produkt	Land
	BioMilQ ¹	Humane brystepithelceller	Modermælkserstatning	USA
	TurtleTree ²	Både humane brystepithelceller og bovine yverepithelceller	Mælk og mælkeingredienser	Singapore/USA
	Opalia ³	Bovine yverepithelceller	Mejeriprodukter	Canada
	Wilk ⁴	Både humane brystepithelceller og bovine yverepithelceller	Mælk og mælkeingredienser	Israel

¹<https://www.biomilq.com/our-science>. Vækst af mælkekirtel-celler foregår i et 3D mikromiljø.

²<https://turtletree.com/>; <https://www.greenqueen.com.hk/turtletree-cellbased-milk-30-million/>

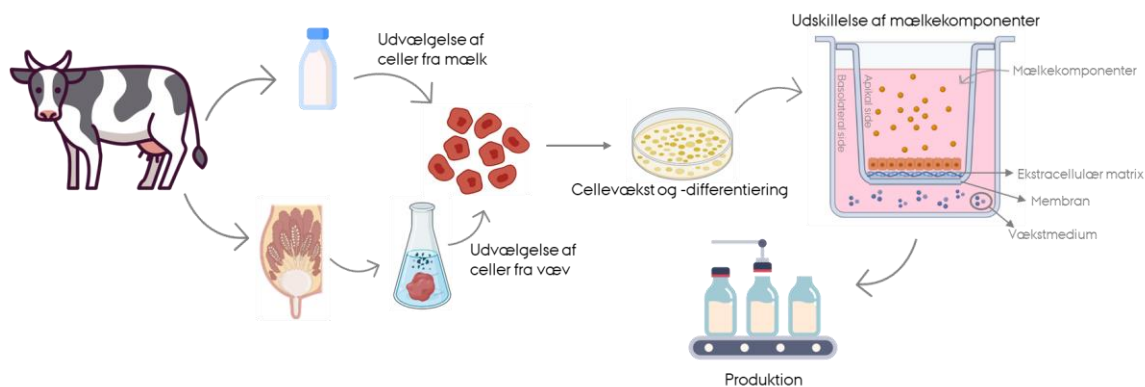
³<https://www.opaliafoods.com/>

⁴<https://wilkismilk.com/behind-the-revolution/>

3.1 Celler, medier og systemer til kultivering

Koens yver består bl.a. af epithelceller, lumen og bindevæv. Epithelceller er celler, der dækker kroppens overflader som f.eks. hud, tarmvæv og væv i andre indre organer. Mælkekirtlernes evne til at producere og

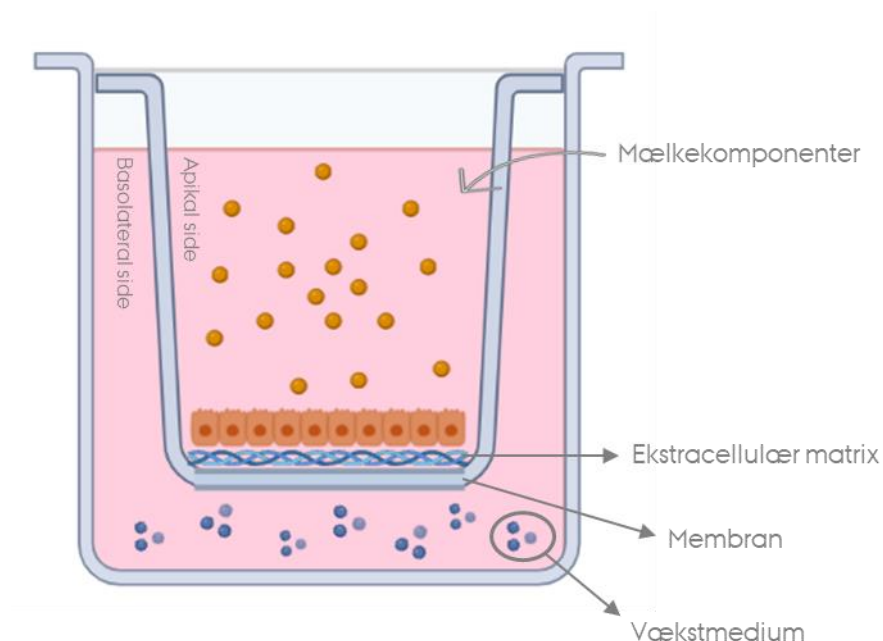
udskille mælk i yveret afhænger både af mængden af epithelceller og deres aktivitet. Mængden af epithelceller afhænger af koens laktationsstadie. Både vækst og differentiering af cellerne samt udskillelsen af mælk er under hormonal kontrol. Det er de mælke-syntetiserende epithelceller, der anvendes til *in vitro* kultivering. Epithelcellerne til kultiveret mælk kan være udtaget fra mælkekirtlen i forbindelse med slagting eller fra mælken, hvor 1-2 % af mælkens somatiske cellepulje udgøres af epithelceller. For at dyrke yverepithelcellerne skal vævet først findeles og fordøjes med enzymer, som bidrager til at epithelcellerne frigøres fra bindevævet (Figur 2). Derefter oprenses og karakteriseres cellerne for at sikre, at de rigtige typer af celler overføres til dyrkningsmediet. Hvis mælken bruges som ophav for epithelcellerne, isoleres disse fra frisk mælk, der centrifugeres, hvorved mælkens cellepulje isoleres. Herfra skal epithelcellerne isoleres fra mælkens øvrige cellepulje (Figur 2).



Figur 2: Overordnede trin i forbindelse med udtagning og kultivering af yverepithelceller med henblik på vækst og udskillelse af mælkekomponenter. Lavet ved hjælp af BioRender og Flaticon.

Dette gøres ved at dyrke cellerne på et medium, der, udover de nødvendige næringsstoffer, indeholder laktationshormoner, som muliggør celledifferentiering. For at høste de komponenter, der udskilles, er der behov for et teknologisk system, som kan sikre at mælkekomponenter kan opsamles adskilt fra det tilgående næringsmedie, ultimativt i et kontinuerlig flow. En sådan adskillelse er dog endnu ikke mulig. I Figur 3 er det vist hvordan dyrkningsteknikken for nuværende udfolder sig ved brug af en "scaffold" baseret dyrkning, hvor dyrkningsmediet (på cellernes basolaterale side) er adskilt fra den sekretoriske side (cellernes apikale side) (Hillreiner et al. 2017). Cellerne gror på en matrix eller "scaffold" bestående af biologiske hydrogeler, der svarer til den extracellulære matrix som cellerne normalt vokser på i koens yver. Den kan bestå af materialer som f.eks. kollagen eller gelatine. Kollagen og gelatine er animalske produkter, hvorimod alginat er et muligt fremtidigt plantebaseret alternativ i denne produktion (Okamoto et al. 2020). Udover de biologiske hydrogeler findes der også materialer som polyethylene glycol eller hyaluronsyre. Mediet på den

basolaterale side vil indeholde aminosyrer, vitaminer og mineraler, som er nødvendige for cellernes vækst og syntese. Desuden skal der også være laktationshormoner til stede, som f.eks. prolaktin eller et hypofyse-ekstrakt indeholdende prolaktin. Der anvendes normalt animalsk serum og ofte føtal kalveserum (FBS), til at dyrke og opformere cellerne i kultur, da dette serum indeholder en række nødvendige komponenter, som vækstfaktorer, der er nødvendige for cellernes vækst. Nye undersøgelser har peget på muligheden for at nedskalere indholdet af FBS (Sattari, Kjærup, et al. 2024), hvilket kan være ønskværdigt i et bæredygtighedsperspektiv. Mælkekomponenterne bliver udskilt på den apikale side, hvorfra de kan opsamles. På den apikale side skal der således ikke være aminosyrer og andre næringsmedier til stede, men kun et medie med opløste salte.



Figur 3: Illustration af forsøgsopsætningen ved brug af "transwell" to-kammersystem til dyrkning af bovine epithelceller i laboratoriet med henblik på at inducere produktion af mælkekomponenter. Lavet ved hjælp af BioRender og Flaticon.

Syntese af mælkeprotein, laktose og triglycerider er blevet påvist i et sådant system (Walter et al. 2020) og 3D kulturer af bovine mælkeceller er rapporteret i flere studier (Che et al. 2024; Hillreiner et al. 2017; Sattari et al. 2023; Sattari, Kjærup, et al. 2024; Sattari, Rasmussen, et al. 2024; Tsugami et al. 2020; Walter et al. 2020). De få studier, der er publiceret indenfor området har bl.a. påvist, at en række proteiner kan syntetiseres, men at ikke alle komponenter bliver udskilt fra cellerne (Tsugami et al. 2020), og at indholdet af mælkekomponenter er meget lavt (Che et al. 2024; Sattari et al. 2023). Det debatteres i øjeblikket inden for

forskning om systemet kræver dannelse af organoider, dvs samling af flere typer celler, som udtages fra bovint væv og dyrkes, og som kunne forventes at være mere biologisk effektive. To-kammer systemet er udelukkende til forskning og udvikling, da det ikke vil kunne understøtte en kontinuerlig flux fra den basolaterale side, hvor næringsmediet tilføjes og til den apikale side, hvor de producerede biomolekyler udskilles - det såkaldte sekretom. Der arbejdes, især i startupvirksomheder, som TurtleTree (Singapore og USA), Biomilq (USA) og Wilk (Israel) med udvikling af biofiber/hule strå- eller bioreaktor-baserede teknologier for at opskalere produktionen.

Ligesom de rekombinante proteiner syntetiseret ved præcisionsfermentering kan de syntetiserede proteiner fra kultiveret mælk analyseres ved hjælp af f.eks. LC-MS (Le, Deeth, and Larsen 2017). Hillreiner et al. (2017) brugte blandt andet LC-MS/MS til at identificere proteiner i sekretomer fra 3D systemets apikale side (Figur 3) og identificerede 56 proteiner, herunder α_{s1} -kasein, β -kasein, α -laktalbumin og β -laktoglobulin (Hillreiner et al. 2017). Proteinerne blev dog udelukkende identificeret og ikke kvantificeret, men arbejdet viste, at mælkeproteinerne kunne udskilles. I et nyt studie blev bovine epithelceller fra mælkekirtelvæv ligeledes dyrket i et to-kammersystem (Figur 3), hvor syntesen af mælkekomponenter blev induceret ved tilsætning af prolaktin på den basolaterale side og sekretomerne blev høstet på den apikale side. Proteomanalyse ved brug af sensitiv og kvantitativ nLC-timsTOF Pro MS/MS kunne identificere mere end 500 forskellige proteiner i sekretomerne, dog i meget lave koncentrationer. De identificerede proteiner omfattede mange cellulære proteiner, men også karakteristiske mælkeproteiner. Kaseinerne udgjorde blot $\leq 1\%$ af det totale protein i sekretomerne. Sekretomerne fra de prolaktin-behandlede celler viste signifikant ($P < 0.05$) opregulering af 351 forskellige proteiner, inklusive mælkeproteiner som α_{s1} -kasein, κ -kasein, β -laktoglobulin, laktotransferrin og osteopontin, hvilket indikerer en positiv regulering af laktation ved behandling med prolaktin i systemet (Che et al. 2024).

In vitro produktion af mælkekomponenter blev også undersøgt af Tsugami et al. (2020) i et studie, hvor der blev brugt bovine epithelceller fra mælkekirtlerne (BMEC'er). Disse celler blev isoleret fra ikke-lakterende Holstein køer (Tsugami et al. 2020). De apikale og basolaterale sider blev adskilt ved at dyrke BMEC'er på en cellekulturindsats med en kollagengel tilsat bovint hypofyseekstrakt og dexamethason for at inducere mælkeudskillelse. *In vitro* modellen viste udskillelse af mælkekomponenter, såsom β -kasein, laktose og triglycerider.

Walter et al. (2020) arbejdede med BMEC'er med henblik på at studere lipidsyntese *in vitro*. Studiet sammenlignede også cellevækst med hhv. ekstracellulær 3D matrix kultur og 2D kulturer (Walter et al. 2020). Desuden blev funktionaliteten af yverepithelceller isoleret fra mælk sammenlignet med BMEC'er isoleret fra bovint yvervæv. For både epithelceller isoleret fra yvervæv og mælk viste det sig, at ekstracellulær 3D matrix var det mest egnede system til *in vitro* kultivering af mælkesyntetiserende celler. Der blev målt

øgede niveauer af CSN3- og DGAT1-genekspression, som er gener relateret til mælkeprotein- og fedtproduktion, samt et øget intracellulært niveau af triacylglycerol.

Et nyt studie (Sattari et al. 2023), viste at ekspressionen af gener for bl.a. α_{s1} - og β -kasein kunne øges ved brug af to-kammer systemet og ved tilsætning af et bovint hypofyseekstrakt, som erstatning for det meget dyre prolaktin (Che et al. 2024).

Da "kultiveret mælk" er baseret på dyrkning af celler fra mælkekirtel epithel, vil det i teorien kunne forventes, at de komponenter som syntetiseres og udskilles fra mælkekirtlen (de fleste proteiner, fedtsyrer, laktose, nogle enzymer m.m.), vil kunne findes i sekretomerne, mens komponenter, som kommer ud i mælken via overførsel fra blodet (for eksempel enzymer som plasminogen) eller fra mælkens celler (en række enzymer) ikke vil være til stede.

Der er flere virksomheder på verdensplan, der arbejder på at kultivere humane brystepithelceller med henblik på produktion af mælkekomponenter, der kan tilsættes modernemælkserstatning, fx BIOMILQ, Wilk, og Turtletree (se tabel 3). Forskningen er dog fortsat på et tidligt stadie, og giver også anledning til flere etiske udfordringer end arbejdet med yverepithelceller fra køer.

3.2 Udfordringer

Inden for kultivering af epithelceller til fremstilling af mælkebestanddele er der store teknologiske udfordringer i forhold til levedygtighed af de dyrkede celler, dyrkningssystem, medier og hormontilsætning, syntese, opskalering og opsamling. Desuden er der en stor udfordring med hensyn til de anvendte medier, som p.t. indeholder animalske komponenter, som f.eks. FBS, der som nævnt stimulerer epithelcellerne til vækst og syntese. Brugen af FBS er imidlertid kontroversiel, da det er et produkt, der stammer fra ufødte kalve. Der er derfor en stor interesse for at finde alternativer til FBS således, at systemet for en fremtidig produktion kan være baseret på bæredygtige medier, som sidestrømme eller planteproteiner, herunder forskellige hydrolysater.

Mammale celler er langt dyrere at dyrke end mikroorganismer, da de mammale celler har brug for særlige vækstfaktorer og næringsstoffer (Takefuji 2021). Derudover er vækstcyklus for en batch af celler på minimum 42 dage udfordrende, da det fordrer strenge produktionsstandarder for at holde kulturen steril (McNabb 2021). På nuværende tidspunkt skal der bruges en relativt stor mængde vækstfaktorer og laktationshormoner i cellekulturdyrkingen, og der er et ønske om og et behov for at reducere brugen af disse, eller helt erstatte dem, da de er vanskelige og dyre at skaffe i store mængder (Takefuji 2021). Et eksempel herpå kan være at erstatte brug af prolaktin (Che et al. 2024b) med hypofysekestrakt (Sattari et al. 2023).

Hvis mange af udfordringerne kunne løses, ville en fordel ved kultiveret mælk, i sammenligning med produktion af mælkeprotein ved præcisionsfermentering, være, at der ved dyrkning af mælkeceller kunne ske en udskillelse af flere af de af mælkens komponenter, som udskilles af mælkeepithellet. Dette kunne være vækstfaktorer og andre stoffer med bioaktive egenskaber.

3.3 Fremtidsperspektiver

Såfremt teknologien videreudvikles og modnes vil det være muligt at anvende de syntetiserede mælkekomponenter til enten specifikke mejeriprodukter eller modernælkserstatning afhængig af den anvendte celletype. Ultimativt kunne det være produkter rettet mod babyer, for tidligt fødte, ældre, eller forbrugersegmenter med specielle behov, f.eks. ved kultivering af celler hvor specielle komponenter kunne induceres. I alle tilfælde er der behov for oprensning og separation fra det tilførte næringsmedie. Dyrkning af humane celler er kontroversielt på grund af etiske overvejelser, men ved kultivering af humane celler er perspektivet, at der kan produceres skræddersyet "modernælk" fra egen moder til babyen, med de potentielle biologiske fordele, det kunne have.

De internationale startupvirksomheder inden for kultiveret mælk har en betydelig kapital bag sig, hvilket skaber momentum, men potentialet for fremtidig disruption af den nuværende mælkeproduktion er uvis. Det vurderes, at der er gode muligheder for etablering og produktion af kultiveret mælk i Danmark, og der vurderes ikke til at være specielle barrierer i Danmark, frem for andre lande, rent produktionsmæssigt. Det vil kræve viden, kapital og regulatorisk godkendelse af kultiveret mælk som fødevarer.

Det forventes ikke, at kultiveret mælk vil erstatte amning, men have perspektiver indenfor modernælkserstatning samt ingrediensindustrien. Det er et område hvor Danmark og danske virksomheder kan have en betydelig position, og hvis teknologien modnes, og området etableres, vil der være betydelige eksportmuligheder.

Hvis de teknologiske og biologiske barrierer løses, vil kultiveret mælk muligvis kunne produceres med lavere klimaaftryk end komælk, men det vil afhænge af den endelige teknologi og mulighederne for opskalering af produktionen. Der foreligger for nuværende ikke beregninger herpå, da teknologien er på et tidligt stadium.

Selv hvis/når selve bioreaktor eller organoid problematikken løses, er der stadig en række mere biologisk baserede udfordringer, der mangler at blive løst. Det skyldes bl.a. manglende viden om betydning af biologisk variation for udtagning af cellerne, identifikation og oprensning af de rette celletyper fra vævet/mælken, levedygtigheden af disse, eventuel kemisk eller anden transformation af de differentierede epithelceller tilbage til en form for stam-celle med bedre levedygtighed, krav til vækstmedie og tilsatte hormoner.

Der er behov for forskning og integrering med præcisionsfermenteringsområdet, da en del af udfordringerne med bæredygtige medier og hormoner muligvis kan løses gennem synergi med denne teknologi (Good Food Institute 2021). Der er igangsat national forskning indenfor området. Da området er præget af start-ups er der manglende vidensdeling, og dermed er der behov for fortsat og kontinuerlig forskning for offentlige midler, der kan understøtte national positionering og uddannelse af nye medarbejdere.

Sammenlignet med præcisionsfermentering, hvor der med den nuværende teknologi typisk produceres enkelte proteiner, som efterfølgende skal blandes og potentielt samles i kaseinmiceller, forventer produktet udskilt af kultiverede yverceller at være tættere på den komplekse matrix, som kendetegner mælk. Det skal dog afklares i hvor høj grad cellebaseret mælk vil indeholde de samme mælkekomponenter og komplekse strukturer, som er til stede i mælk, herunder kaseinmiceller, fedtkugler, laktose, vitaminer og mineraler. Der forskes i det for øjeblikket, både nationalt og internationalt.

4 Forskningsinitiativer indenfor cellebaseret produktion af mælkebestanddele ved Institut for Fødevarer, Aarhus Universitet

Der er for nuværende en række forskningsprojekter i gang ved Institut for Fødevarer, Aarhus Universitet, i samarbejde med især Institut for Husdyr- og Veterinærvidenskab, AU-Viborg indenfor kultiveret mælk samt indenfor præcisionsfermentering i samarbejde med forskere ved Novo Nordisk Foundation Center for Biosustainability, DTU. Forskellige forskningsinitiativer, som AU-FOOD er med i, indenfor kultiveret produktion af mælkebestanddele gennemgås kort i dette afsnit. Desuden er AU FOOD leder af det nye AUFF-flagskib, CellFood, som skal styrke forskningen indenfor kultiveret landbrug. ([Institut for Fødevarer sætter skub i udviklingen af cellulære fødevarer \(au.dk\)](#)).

4.1 DECIPHER

DECIPHER projektet ([https://pure.au.dk/portal/da/projects/paving-the-way-for-microbial-caseins--deciphering-the-importance-of-posttranslational-modifications--decipher\(e63206c9-38d6-48b5-bfd3-3dbae91cddb1e\).html](https://pure.au.dk/portal/da/projects/paving-the-way-for-microbial-caseins--deciphering-the-importance-of-posttranslational-modifications--decipher(e63206c9-38d6-48b5-bfd3-3dbae91cddb1e).html)) er et projekt støttet af Novo Nordisk Fonden (NNF) og udføres i et samarbejde mellem DTU, Chalmers og AU-FOOD. DECIPHER projektet består af tilknyttede PhD projekter og to post docs og omhandler mikrobiel produktion af bovine kaseiner og undersøgelse af hvordan disse kan modificeres så de producerede kaseiner opnår en ønsket funktionalitet, som for eksempel calciumbinding, gennem de rette PTMer. Desuden er målet at karakterisere de producerede proteiner og undersøge deres funktionalitet og ernæringsmæssige kvaliteter; dette er en del af det PhD i projektet, som foregår ved AU. Projektet løber i perioden 01.04.2022 - 31.03.2025.

4.2 CleanPro

CleanPro projektet består af to dele, CleanMilk og CleanMeat ([CleanMeat and CleanMilk – future sustainable food production – Research – Aarhus University \(au.dk\)](#)) er et projekt støttet af Landbrugsstyrelsen under Ministeriet for Fødevarer, landbrug og fiskeri. CleanMilk projektdelen udgøres primært af et PhD projekt, der har til formål at:

- Etablere metoder til at dyrke epithelceller fra mælkekirtelvæv under betingelser som medvirker til at der udskilles mælkekomponenter
- Teste hvilke medier og hormoner der kan medvirke til denne udskillelse

- Karakterisere sammensætning af de udskilte komponenter i cellesystemerne
- Bidrage til udviklingen af en "life cycle assesment" (LCA analyse)

Projektet løb i perioden 01.10-2019 – 30.6-2023.

4.3 CleanMilk

I et parallelt projekt, kaldet CleanMilk, støttet af Mejeribrugets ForskningsFond ([Composition of "CleanMilk" from in vitro grown milk cells - Research - Aarhus University \(au.dk\)](#)) undersøges parallelt metoder til at isolere og dyrke epithelceller fra mælkekirtelvæv, men til forskel fra CleanPro projektet, er cellerne isoleret fra mælk og ikke fra slagtedyr. CleanMilk projektdelen udgøres især af en post doc og et tilknyttet PhD projekt, der tilsammen har til formål at:

- Isolere mælkekirtlepitheelceller fra den somatiske cellepulje i mælk, dyrke disse i robuste *in vitro* systemer, og høste deres mælkelignende sekreter
- At undersøge de makromolekylære strukturer i disse mælkelignende sekreter, inklusive deres fedt-kugler, kaseinmiceller og kalciumfordeling
- At sammenligne sekreter fra celler isoleret fra den somatiske cellepulje med sammensætningen af komælk, samt med de sekreter der opnås ved dyrkning af celler isoleret fra selve mælkekirtlen

Projektet løber i perioden 1.9.2021-31.12.2024.

5 Referencer

- Antuma, Laurens J., Isabell Steiner, Vasil M. Garamus, Remko M. Boom, and Julia K. Keppler. 2023. "Engineering Artificial Casein Micelles for Future Food: Is Casein Phosphorylation Necessary?" *Food Research International* 173: 113315. doi:10.1016/j.foodres.2023.113315.
- Aro, Nina, Dilek Ercili-Cura, Martina Andberg, Pia Silventoinen, Martina Lille, Waltteri Hosia, Emilia Nordlund, and Christopher P. Landowski. 2023. "Production of Bovine Beta-Lactoglobulin and Hen Egg Ovalbumin by *Trichoderma Reesei* Using Precision Fermentation Technology and Testing of Their Techno-Functional Properties." *Food Research International* 163: 112131. doi:10.1016/j.foodres.2022.112131.
- Batt, Carl A., Laurel D. Rabson, Dominic W. S. Wong, and John E. Kinsella. 1990. "Expression of Recombinant Bovine β -Lactoglobulin in *Escherichia Coli*." *Agricultural and Biological Chemistry* 54(4): 949–55. doi:10.1080/00021369.1990.10870080.
- Beauchamp, Derek, Perumal Gandhi, Louis Hom, Shaowen Ji, and Ryan Pandya. 2019. "Food Compositions Comprising Recombinant Milk Proteins and Methods of Producing the Same." *Perfect Day Inc.* doi:AU2019284081B2.
- Belitz, H-D., Werner Grosch, and Peter Schieberle. 2008. *Food Chemistry*. Springer Science & Business Media.
- Bijl, E., H.J.F. Van Valenberg, T. Huppertz, A.C.M. Van Hooijdonk, and H. Bovenhuis. 2014. "Phosphorylation of α S1-Casein Is Regulated by Different Genes." *Journal of Dairy Science* 97(11): 7240–46. doi:10.3168/jds.2014-8061.
- Bijl, Etske, John W. Holland, and Mike Boland. 2020. "Posttranslational Modifications of Caseins." In *Milk Proteins*, Elsevier, 173–211. doi:10.1016/B978-0-12-815251-5.00005-0.
- Chai, Kong F, Kuan R Ng, Malsha Samarasiri, and Wei N Chen. 2022. "Precision Fermentation to Advance Fungal Food Fermentations." *Current Opinion in Food Science* 47: 100881. doi:10.1016/j.cofs.2022.100881.
- Chatel, Jean-Marc, Philippe Langella, Karine Adel-Patient, Jacqueline Commissaire, Jean-Michel Wal, and Gérard Corthier. 2001. "Induction of Mucosal Immune Response after Intranasal or Oral Inoculation of Mice with *Lactococcus Lactis* Producing Bovine Beta-Lactoglobulin." *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology* 8(3): 545–51. doi:10.1128/CDLI.8.3.545-551.2001.
- Chatterton, Dereck E.W., Duc Ninh Nguyen, Stine Brandt Bering, and Per Torp Sangild. 2013. "Anti-Inflammatory Mechanisms of Bioactive Milk Proteins in the Intestine of Newborns." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 45(8): 1730–47. doi:10.1016/j.biocel.2013.04.028.
- Che, Jing, Søren Drud-Heydary Nielsen, Zahra Sattari, Yuan Yue, Stig Purup, Nina Aagaard Poulsen, and Lotte Bach Larsen. 2024. "Proteomic Study of Secretomes from Cellular Agriculture for Milk Production." doi:10.21203/rs.3.rs-3990568/v1.

- Choi, Byung-Kwon, and Rafael Jiménez-Flores. 1996. "Study of Putative Glycosylation Sites in Bovine β -Casein Introduced by PCR-Based Site-Directed Mutagenesis." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44(1): 358–64. doi:10.1021/jf950339i.
- Che, Jing, Zekun Fan, Etske Bijl, Julia Prangchat Stub Thomsen, Ivan Mijakovic, Kasper Hettinga, Nina Aagaard Poulsen, and Lotte Bach Larsen. 2025. Unravelling the dominant role of phosphorylation degree in governing the functionality of reassembled casein micelles: Implications for future dairy production through precision fermentation. *Food Hydrocolloids* 159, 110615. doi: 10.1016/j.foodhyd.2024.110615
- Choi, Byung-Kwon, and Rafael Jiménez-Flores. 2001. "Expression and Purification of Glycosylated Bovine β -Casein (L70S/P71S) in *Pichia Pastoris*." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(4): 1761–66. doi:10.1021/jf001298f
- Clare, D.A., and H.E. Swaisgood. 2000. "Bioactive Milk Peptides: A Prospectus." *Journal of Dairy Science* 83(6): 1187–95. doi:10.3168/jds.S0022-0302(00)74983-6.
- Clegg, Roger A., and Carl Holt. 2009. "An E. Coli over-Expression System for Multiply-Phosphorylated Proteins and Its Use in a Study of Calcium Phosphate Sequestration by Novel Recombinant Phosphopeptides." *Protein Expression and Purification* 67(1): 23–34. doi:10.1016/j.pep.2009.04.004.
- De Kruif, Cornelis G., Thom Huppertz, Volker S. Urban, and Andrei V. Petukhov. 2012. "Casein Micelles and Their Internal Structure." *Advances in Colloid and Interface Science* 171–172: 36–52. doi:10.1016/j.cis.2012.01.002.
- Deng, Mengting, Xueqin Lv, Long Liu, Jianghua Li, Guocheng Du, Jian Chen, and Yanfeng Liu. 2022. "Efficient Bioproduction of Human Milk Alpha-Lactalbumin in *Komagataella Phaffii*." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 70(8): 2664–72. doi:10.1021/acs.jafc.1c07908.
- Dewan, R.K., A. Chudgar, R. Mead, V.A. Bloomfield, and C.V. Morr. 1974. "Molecular Weight and Size Distribution of Bovine Milk Casein Micelles." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* 342(2): 313–21. doi:10.1016/0005-2795(74)90086-5.
- Eisner, M. 2024. Milk without animals - A dairy science perspective. *International Dairy Journal*. 156, 105978. doi: 10.1016/j.idairyj.2024.105978
- Elaine Watson. 2022. "'No Longer a Pipedream...' Geltor Completes Commercial-Scale Manufacturing Run of PrimaColl 'Animal-Free' Vegan Collagen for Food and Nutrition Market." *Food Navigator USA*.
- European Union. 2018. "Regulation (EU) 2015/2283." <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2015/2283/oj>.
- Ferrocino, Ilario, Kalliopi Rantsiou, and Luca Cocolin. 2022. "Investigating Dairy Microbiome: An Opportunity to Ensure Quality, Safety and Typicity." *Current Opinion in Biotechnology* 73: 164–70. doi:10.1016/j.copbio.2021.08.009.
- Fox, P. F., and A. L. Kelly. 2012. "Chemistry and Biochemistry of Milk Constituents." In *Food Biochemistry and Food Processing*, ed. Benjamin K. Simpson. Wiley, 442–64. doi:10.1002/9781118308035.ch24.

- García-Montoya, Isui, Jose Salazar-Martínez, Sigifredo Arévalo-Gallegos, Suguey Sinagawa-García, and Quintín Rascón-Cruz. 2013. "Expression and Characterization of Recombinant Bovine Lactoferrin in *E. Coli*." *BioMetals* 26(1): 113–22. doi:10.1007/s10534-012-9598-7.
- Gibson, Matt, Inja Radman, and Arie Abo. 2023. "Cheese and Yogurt like Compositions and Related Methods." *New Culture, USPTO*. doi:US20230141532A1.
- Goda, S. K., A. F. Sharman, M. Yates, N. Mann, N. Carr, N. P. Minton, and J. K. Brehm. 2000. "Recombinant Expression Analysis of Natural and Synthetic Bovine Alpha-Casein in *Escherichia Coli*." *Applied Microbiology and Biotechnology* 54(5): 671–76. doi:10.1007/s002530000435.
- Good Food Institute. 2020. *2020 State of the Industry Report. Fermentation: Meat, Eggs, and Dairy*. <https://gfi.org/wp-content/uploads/2021/04/COR-SOTIR-Fermentation-2021-10-01-1.pdf>.
- Good Food Institute. 2021. *2021 State of the Industry Report. Fermentation: Meat, Eggs, and Dairy*. <https://gfi.org/wp-content/uploads/2022/04/2021-Fermentation-State-of-the-Industry-Report.pdf>.
- Hansson, L., S. Bergstrom, O. Hernell, B. Lonnerdal, A.K. Nilsson, and M. Stromqvist. 1993. "Expression of Human Milk β -Casein in *Escherichia Coli*: Comparison of Recombinant Protein with Native Isoforms." *Protein Expression and Purification* 4(5): 373–81. doi:10.1006/prep.1993.1049.
- Hazebrouck, Stéphane, Laetitia Pothelune, Vasco Azevedo, Gérard Corthier, Jean-Michel Wal, and Philippe Langella. 2007. "Efficient Production and Secretion of Bovine β -Lactoglobulin by *Lactobacillus Casei*." *Microbial Cell Factories* 6(1): 12. doi:10.1186/1475-2859-6-12.
- Hettinga, Kasper, and Etske Bijl. 2022. "Can Recombinant Milk Proteins Replace Those Produced by Animals?" *Current Opinion in Biotechnology* 75: 102690. doi:10.1016/j.copbio.2022.102690.
- Heyland, Jan, Lars M. Blank, and Andreas Schmid. 2011. "Quantification of Metabolic Limitations during Recombinant Protein Production in *Escherichia Coli*." *Journal of Biotechnology* 155(2): 178–84. doi:10.1016/j.jbiotec.2011.06.016.
- Hillreiner, Maria, Nadine I. Müller, Heiner M. Koch, Christiane Schmautz, Bernhard Küster, Michael W. Pfaffl, and Heike Kliem. 2017. "Establishment of a 3D Cell Culture Model of Primary Bovine Mammary Epithelial Cells Extracted from Fresh Milk." *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* 53(8): 706–20. doi:10.1007/s11626-017-0169-7.
- Hui, Y. H., Wai-kit Nip, Leo M. L. Nollet, Gopinadhan Paliyath, and Benjamin K. Simpson. 2006. 769 *Food Biochemistry and Food Processing*. Hoboken: Blackwell Publishing.
- Iglesias-Figueroa, Blanca, Norberto Valdiviezo-Godina, Tania Siqueiros-Cendón, Suguey Sinagawa-García, Sigifredo Arévalo-Gallegos, and Quintín Rascón-Cruz. 2016. "High-Level Expression of Recombinant Bovine Lactoferrin in *Pichia Pastoris* with Antimicrobial Activity." *International Journal of Molecular Sciences* 17(6): 902. doi:10.3390/ijms17060902.
- Impossible Foods. 2020. "How Do You Make Heme?"

- Jensen, Hanne B., Katrine S. Pedersen, Lene B. Johansen, Nina A. Poulsen, Mette Bakman, Dereck E.W. Chatterton, and Lotte B. Larsen. 2015. "Genetic Variation and Posttranslational Modification of Bovine κ -Casein: Effects on Caseino-Macropptide Release during Renneting." *Journal of Dairy Science* 98(2): 747–58. doi:10.3168/jds.2014-8678.
- Jimenez-Flores, Rafael, Thomas Richardson, and Linda F. Bisson. 1990. "Expression of Bovine β -Casein in *Saccharomyces Cerevisiae* and Characterization of the Protein Produced in Vivo." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38(4): 1134–41. doi:10.1021/jf00094a049.
- Jin, Liang, Lihong Li, Wenchi Zhang, Rongzhen Zhang, and Yan Xu. 2022. "Heterologous Expression of Bovine Lactoferrin C-Lobe in *Bacillus Subtilis* and Comparison of Its Antibacterial Activity with N-Lobe." *Systems Microbiology and Biomanufacturing* 2(2): 345–54. doi:10.1007/s43393-021-00066-4.
- Jin, Liang, Lihong Li, Lixian Zhou, Rongzhen Zhang, Yan Xu, and Jiming Li. 2019. "Improving Expression of Bovine Lactoferrin N-Lobe by Promoter Optimization and Codon Engineering in *Bacillus Subtilis* and Its Antibacterial Activity." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 67(35): 9749–56. doi:10.1021/acs.jafc.9b02350.
- Kalidas, Chitkala, Lokesh Joshi, and Carl Batt. 2001. "Characterization of Glycosylated Variants of β -Lactoglobulin Expressed in *Pichia Pastoris*." *Protein Engineering, Design and Selection* 14(3): 201–7. doi:10.1093/protein/14.3.201.
- Kang, Young C., and T. Richardson. 1988. "Molecular Cloning and Expression of Bovine κ -Casein in *Escherichia Coli*." *Journal of Dairy Science* 71(1): 29–40. doi:10.3168/jds.S0022-0302(88)79521-1.
- Karbalaei, Mohsen, Seyed A. Rezaee, and Hadi Farsiani. 2020. "*Pichia Pastoris*: A Highly Successful Expression System for Optimal Synthesis of Heterologous Proteins." *Journal of Cellular Physiology* 235(9): 5867–81. doi:10.1002/jcp.29583.
- Keppler, Julia K., Anja Heyse, Eva Scheidler, Maximilian J. Uttinger, Laura Fitzner, Uwe Jandt, Timon R. Heyn, et al. 2021. "Towards Recombinantly Produced Milk Proteins: Physicochemical and Emulsifying Properties of Engineered Whey Protein Beta-Lactoglobulin Variants." *Food Hydrocolloids* 110: 106132. doi:10.1016/j.foodhyd.2020.106132.
- Kim, Y.K., B.H. Chung, S. Yoon, K.-K. Lee, B. Lønnerdal, and D.-Y. Yu. 1997. "High-Level Expression of Human α 1-Casein in *Escherichia Coli*." *Biotechnology Techniques* 11(9): 675–78. doi:10.1023/A:1018463411263.
- Kim, Yoo-Kyeong, Dae-Yeul Yu, Hyun-Ah Kang, Sun Yoon, and Bong-Hyun Chung. 1999. "Secretory Expression of Human α -Casein in *Saccharomyces Cerevisiae*." *The Korean Society for Microbiology and Biotechnology* 9(2): 196–200.
- Layman, Donald K, Bo Lønnerdal, and John D Fernstrom. 2018. "Applications for α -Lactalbumin in Human Nutrition." *Nutrition Reviews* 76(6): 444–60. doi:10.1093/nutrit/nuy004.
- Le, Thao T., Hilton C. Deeth, and Lotte B. Larsen. 2017. "Proteomics of Major Bovine Milk Proteins: Novel Insights." *International Dairy Journal* 67: 2–15. doi:10.1016/j.idairyj.2016.11.016.

- Liu, Dasong, Yuanyuan Wang, Yun Yu, Jinhua Hu, Naiyan Lu, Joe M. Regenstein, Miao Wang, and Peng Zhou. 2016. "Effects of Enzymatic Dephosphorylation on Infant in Vitro Gastrointestinal Digestibility of Milk Protein Concentrate." *Food Chemistry* 197: 891–99. doi:10.1016/j.foodchem.2015.11.074.
- Loch, Joanna I., Piotr Bonarek, Magdalena Tworzydło, Agnieszka Polit, Barbara Hawro, Aneta Łach, Eryk Ludwin, and Krzysztof Lewiński. 2016. "Engineered β -Lactoglobulin Produced in *E. Coli*: Purification, Biophysical and Structural Characterisation." *Molecular Biotechnology* 58(10): 605–18. doi:10.1007/s12033-016-9960-z.
- Lovmar, M, and M Ehrenberg. 2006. "Rate, Accuracy and Cost of Ribosomes in Bacterial Cells." *Biochimie* 88(8): 951–61. doi:10.1016/j.biochi.2006.04.019.
- Lucey, John A., and David S. Horne. 2018. "Perspectives on Casein Interactions." *International Dairy Journal* 85: 56–65. doi:10.1016/j.idairyj.2018.04.010.
- Mallapaty, Smriti. 2019. "Australian Gene-Editing Rules Adopt 'Middle Ground.'" *Nature*: d41586-019-01282-88. doi:10.1038/d41586-019-01282-8.
- Mapelli-Brahm, Paula, Francisco J. Barba, Fabienne Remize, Cyrielle Garcia, Amandine Fessard, Amin Mousavi Khaneghah, Anderson S. Sant'Ana, et al. 2020. "The Impact of Fermentation Processes on the Production, Retention and Bioavailability of Carotenoids: An Overview." *Trends in Food Science & Technology* 99: 389–401. doi:10.1016/j.tifs.2020.03.013.
- McNabb, Warren. 2021. "Feed Our Future: A New Zealand Sustainable Food Systems Dialogue." *Riddet Institute Vol 77* (3–4) 2021.
- Mertens, Stijn, Brigida Gallone, Jan Steensels, Beatriz Herrera-Malaver, Jeroen Cortebeek, Robbe Nolmans, Veerle Saels, Valmik K. Vyas, and Kevin J. Verstrepen. 2019. "Reducing Phenolic Off-Flavors through CRISPR-Based Gene Editing of the FDC1 Gene in *Saccharomyces Cerevisiae* x *Saccharomyces Eubayanus* Hybrid Lager Beer Yeasts" ed. Joseph Schacherer. *PLOS ONE* 14(1): e0209124. doi:10.1371/journal.pone.0209124.
- Miller, Gregory D, Lois D McBean, and Judith K Jarvis. 2006. *Handbook of Dairy Foods and Nutrition*. CRC press.
- Nagao, Masaya, Yoshimi Nakagawa, Atsushi Ishii, Ryuzo Sasaki, Harutaka Tanaka, and Hideo Chiba. 1988. "Expression of Bovine .ALPHA.S1-Casein cDNA in *Escherichia Coli*." *Agricultural and Biological Chemistry* 52(1): 191–200. doi:10.1271/bbb1961.52.191.
- Oh, Sangsuk. 1990. *Genetic Engineering of Bovine κ -Casein to Enhance Its Nutritive Value and Its Sensitivity to Proteolysis by Chymosin*. University of California, Davis ProQuest Dissertations Publishing.
- Okamoto, Motoki, Sayako Matsumoto, Ayato Sugiyama, Kei Kanie, Masakatsu Watanabe, Hailing Huang, Manahil Ali, et al. 2020. "Performance of a Biodegradable Composite with Hydroxyapatite as a Scaffold in Pulp Tissue Repair." *Polymers* 12(4): 937. doi:10.3390/polym12040937.
- Oliveira, Carla, and Lucília Domingues. 2018. "Guidelines to Reach High-Quality Purified Recombinant Proteins." *Applied Microbiology and Biotechnology* 102(1): 81–92. doi:10.1007/s00253-017-8623-8.

- Pedersen, Louise Juul, Anders Hauer Møller, and Trine Kastrup Dalsgaard. 2023. "Analyse Af Grønne Proteiner Til Fødevarer." Rådgivningsrapport fra DCA – Nationalt Center for Fødevarer og Jordbrug, Aarhus Universitet: 93 sider.
- Ponniah, Komala, Trevor S. Loo, Patrick J.B. Edwards, Steven M. Pascal, Geoffrey B. Jameson, and Gillian E. Norris. 2010. "The Production of Soluble and Correctly Folded Recombinant Bovine β -Lactoglobulin Variants A and B in Escherichia Coli for NMR Studies." *Protein Expression and Purification* 70(2): 283–89. doi:10.1016/j.pep.2009.12.006.
- Poulsen, N.A., H.P. Bertelsen, H.B. Jensen, F. Gustavsson, M. Glantz, H. Lindmark Månsson, A. Andrén, et al. 2013. "The Occurrence of Noncoagulating Milk and the Association of Bovine Milk Coagulation Properties with Genetic Variants of the Caseins in 3 Scandinavian Dairy Breeds." *Journal of Dairy Science* 96(8): 4830–42. doi:10.3168/jds.2012-6422.
- Poulsen, Nina Aagaard, and Lotte Bach Larsen. 2022. "Genetic Factors Affecting the Composition and Quality of Cow's Milk." In *Burleigh Dodds Series in Agricultural Science*, Aarhus University, Denmark: Burleigh Dodds Science Publishing, 501–32. doi:10.19103/AS.2022.0099.15.
- Pringels, Lentel, Valérie Broeckx, Kurt Boonen, Bart Landuyt, and Liliane Schoofs. 2018. "Abundant Plasma Protein Depletion Using Ammonium Sulfate Precipitation and Protein A Affinity Chromatography." *Journal of Chromatography B* 1089: 43–59. doi:10.1016/j.jchromb.2018.04.045.
- Lasse Solheim et al. 2024. Paving the way towards animal free milk proteins. Roadmap Protein-Frontiers PP. 1-47.
- Róin, Natacha Roed, Gayani Madushani Sirinayake Lokuge, Mads Bugge Fredsted, Ulrik Kræmer Sundkilde, Mette Krogh Larsen, Lotte Bach Larsen, and Nina Aagaard Poulsen. 2023. "Variations in Fatty Acids, Micronutrients and Metabolites in Discrete Milk Lines of Danish Dairy Milk." *International Dairy Journal* 147: 105786. doi:10.1016/j.idairyj.2023.105786.
- Sandra, S., M. Ho, M. Alexander, and M. Corredig. 2012. "Effect of Soluble Calcium on the Renneting Properties of Casein Micelles as Measured by Rheology and Diffusing Wave Spectroscopy." *Journal of Dairy Science* 95(1): 75–82. doi:10.3168/jds.2011-4713.
- Sattari, Zahra, Rikke Brødsgaard Kjærup, Martin Krøyer Rasmussen, Yuan Yue, Nina Aagaard Poulsen, Lotte Bach Larsen, and Stig Purup. 2024. "Bovine Mammary Epithelial Cells Can Grow and Express Milk Protein Synthesis Genes at Reduced Fetal Bovine Serum Concentration." *Cell Biology International* 48(4): 473–82. doi:10.1002/cbin.12116.
- Sattari, Zahra, Søren D. Nielsen, Jing Che, Martin Krøyer Rasmussen, Yuan Yue, Stig Purup, Nina Aagaard Poulsen, and Lotte Bach Larsen. 2023. "Lactogenic Treatment Effects on Milk Synthesis Genes and Protein Secretion in Cultured Bovine Mammary Epithelial Cells." doi:10.2139/ssrn.4656886.
- Sattari, Zahra, Martin Krøyer Rasmussen, Nina Aagaard Poulsen, Rikke Brødsgaard Kjærup, Yuan Yue, Lotte Bach Larsen, and Stig Purup. 2024. "Assessing Cellular Agriculture Potential: Population Homogeneity and Gene Expression in Cultured Bovine Mammary Epithelial Cells." *Future Foods* 9: 100340. doi:10.1016/j.fufo.2024.100340.
- Shennan, D. B., and M. Peaker. 2000. "Transport of Milk Constituents by the Mammary Gland." *Physiological Reviews* 80(3): 925–51. doi:10.1152/physrev.2000.80.3.925.

- Shigemori, Suguru, Shinichi Yonekura, Takashi Sato, Maya Nakanishi, Hajime Otani, and Takeshi Shimosato. 2012. "Expression of a Biologically Active GFP- α S1-Casein Fusion Protein in *Lactococcus Lactis*." *Current Microbiology* 64(6): 569–75. doi:10.1007/s00284-012-0111-x.
- Simons, Guus, Wim Van Den Heuvel, Theo Reynen, Adri Frijters, Ger Rutten, Charles J. Slangen, Martien Groenen, Willem M. De Vos, and Roland J. Siezen. 1993. "Overproduction of Bovine β -Casein in *Escherichia Coli* and Engineering of Its Main Chymosin Cleavage Site." *Protein Engineering, Design and Selection* 6(7): 763–70. doi:10.1093/protein/6.7.763.
- Sundekilde, Ulrik, Lotte Larsen, and Hanne Bertram. 2013. "NMR-Based Milk Metabolomics." *Metabolites* 3(2): 204–22. doi:10.3390/metabo3020204.
- Takefuji, Yoshiyasu. 2021. "Sustainable Protein Alternatives." *Trends in Food Science & Technology* 107: 429–31. doi:10.1016/j.tifs.2020.11.012.
- Teng, Ting Shien, Yi Ling Chin, Kong Fei Chai, and Wei Ning Chen. 2021. "Fermentation for Future Food Systems: Precision Fermentation Can Complement the Scope and Applications of Traditional Fermentation." *EMBO reports* 22(5): e52680. doi:10.15252/embr.202152680.
- Teng, Zi, Ruoyang Xu, and Qin Wang. 2015. "Beta-Lactoglobulin-Based Encapsulating Systems as Emerging Bioavailability Enhancers for Nutraceuticals: A Review." *RSC Advances* 5(44): 35138–54. doi:10.1039/C5RA01814E.
- Tenori, Leonardo, Claudio Santucci, Gaia Meoni, Valentina Morrocchi, Giacomo Matteucci, and Claudio Luchinat. 2018. "NMR Metabolomic Fingerprinting Distinguishes Milk from Different Farms." *Food Research International* 113: 131–39. doi:10.1016/j.foodres.2018.06.066.
- Terefe, Netsanet Shiferaw. 2022. "Recent Developments in Fermentation Technology: Toward the next Revolution in Food Production." In *Food Engineering Innovations Across the Food Supply Chain*, Elsevier, 89–106. doi:10.1016/B978-0-12-821292-9.00026-1.
- Thurmond, Jennifer M., Robert G. Hards, C.Thomas Seipelt, Amanda E. Leonard, Lennart Hansson, Mats Strömqvist, Mona Byström, et al. 1997. "Expression and Characterization of Phosphorylated Recombinant Human β -Casein in *Escherichia Coli*." *Protein Expression and Purification* 10(2): 202–8. doi:10.1006/prep.1997.0737.
- Totsuka, Mamoru, Yoshinori Katakura, Makoto Shimizu, Izumi Kumagai, Kin-ichiro Miura, and Shuichi Kaminogawa. 1990. "Expression and Secretion of Bovine β -Lactoglobulin in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Agricultural and Biological Chemistry* 54(12): 3111–16. doi:10.1080/00021369.1990.10870482.
- Tsugami, Yusaku, Norihiro Suzuki, Manabu Kawahara, Takahiro Suzuki, Takanori Nishimura, and Ken Kobayashi. 2020. "Establishment of an in Vitro Culture Model to Study Milk Production and the Blood–Milk Barrier with Bovine Mammary Epithelial Cells." *Animal Science Journal* 91(1): e13355. doi:10.1111/asj.13355.
- Tubb, Catherine, and Tony Seba. 2021. "Rethinking Food and Agriculture 2020–2030: The Second Domestication of Plants and Animals, the Disruption of the Cow, and the Collapse of Industrial Livestock Farming." *Industrial Biotechnology* 17(2): 57–72. doi:10.1089/ind.2021.29240.ctu.

- Van Wyk, Niël, Heinrich Kroukamp, Monica I. Espinosa, Christian Von Wallbrunn, Jürgen Wendland, and Isak S. Pretorius. 2020. "Blending Wine Yeast Phenotypes with the Aid of CRISPR DNA Editing Technologies." *International Journal of Food Microbiology* 324: 108615. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108615.
- Vestergaard, Mike, Siu Hung Joshua Chan, and Peter Ruhdal Jensen. 2016. "Can Microbes Compete with Cows for Sustainable Protein Production - A Feasibility Study on High Quality Protein." *Scientific Reports* 6(1): 36421. doi:10.1038/srep36421.
- Viaene, Ann, Guido Volckaert, Marcel Joniau, Annie De Baetselier, and Frans Van Cauwelaert. 1991. "Efficient Expression of Bovine A-lactalbumin in *Saccharomyces Cerevisiae*." *European Journal of Biochemistry* 202(2): 471-77. doi:10.1111/j.1432-1033.1991.tb16396.x.
- Walstra, Pieter, Jan T. M. Wouters, and Tom J. Geurts. 2006. *Dairy Science and Technology*. Taylor and Francis.
- Walter, Leonie, Richard Fry, Amy Logan, and Brian J. Leury. 2020. "Investigation on the Suitability of Milk-Derived Primary Bovine Mammary Epithelial Cells Grown on Permeable Membrane Supports as an in Vitro Model for Lactation." *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* 56(5): 386-98. doi:10.1007/s11626-020-00457-2.
- Wang, M, W A Scott, K R Rao, J Udey, G E Conner, and K Brew. 1989. "Recombinant Bovine α -Lactalbumin Obtained by Limited Proteolysis of a Fusion Protein Expressed at High Levels in *Escherichia Coli*." *Journal of Biological Chemistry* 264(35): 21116-21. doi:10.1016/S0021-9258(19)30054-7.
- Ward, Owen P. 2012. "Production of Recombinant Proteins by Filamentous Fungi." *Biotechnology Advances* 30(5): 1119-39. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.09.012.
- Ward, Pauline P., Jing-Y. Lo, Mairead Duke, Gregory S. May, Denis R. Headon, and Orla M. Conneely. 1992. "Production of Biologically Active Recombinant Human Lactoferrin in *Aspergillus Oryzae*." *Nature Biotechnology* 10(7): 784-89. doi:10.1038/nbt0792-784.
- Ward, Pauline P., Gregory S. May, Denis R. Headon, and Orla M. Conneely. 1992. "An Inducible Expression System for the Production of Human Lactoferrin in *Aspergillus Nidulans*." *Gene* 122(1): 219-23. doi:10.1016/0378-1119(92)90054-S.
- Ward, Pauline P., Christopher S. Piddington, Grainne Cunningham, Xiaodong Zhou, Roger D. Wyatt, and Orla M. Conneely. 1997. "Expression and Functional Analysis of Recombinant Human Lactoferrin." In *Lactoferrin*, eds. T. William Hutchens and Bo Lönnnerdal. Totowa, NJ: Humana Press, 155-76. doi:10.1007/978-1-4612-3956-7_11.
- Williams, Richard A. 2021. "Opportunities and Challenges for the Introduction of New Food Proteins." *Annual Review of Food Science and Technology* 12(1): 75-91. doi:10.1146/annurev-food-061220-012838.

Om DCA

DCA - Nationalt Center for Fødevarer og Jordbrug er den faglige indgang til jordbrugs- og fødevarerforskningen ved Aarhus Universitet.

Centret omfatter institutter og forskningsmiljøer, der har aktiviteter på jordbrugs- og fødevarerområdet. Det er primært Institut for Agroøkologi, Institut for Husdyrvidenskab, Institut for Fødevarer, Center for Kvantitativ Genetik og Genomforskning samt dele af Institut for Ingeniørvidenskab.

Aktiviteterne i DCA understøttes af en centerenhed, der varetager og koordinerer opgaver omkring myndighedsbetjening, erhvervs- og sektorsamarbejde, internationalt samarbejde og kommunikation.

Forskningsresultater fra DCA

Resultater fra forskningen publiceres i internationale, videnskabelige tidsskrifter. Publikationerne kan findes via universitets publikationsdatabase (pure.au.dk).

DCA rapporter

DCA's rapportserie formidler hovedsageligt myndighedsrådgivning fra DCA til Miljø- og Fødevareministeriet. Der kan også udgives rapporter, som formidler viden fra forskningsaktiviteter. Rapporterne kan frit hentes på centrets hjemmeside: dca.au.dk.

Nyhedsbreve

DCA udsender et nyhedsbrev, der løbende orienterer om jordbrugs- og fødevarerforskningen og herunder om nye forskningsresultater, rådgivning, uddannelse, arrangementer og andre aktiviteter. Det er gratis at tilmelde sig nyhedsbrevet, og det kan ske på dca.au.dk.

RESUME

Som en del af den grønne omstilling er der på verdensplan et betydeligt momentum for at finde nye strategier for produktion af mælk og kød. I denne vidensyntese præsenterer vi én af disse strategier, nemlig cellebaseret produktion af mælkebestanddele ved brug af to forskellige teknologier: Præcisionsfermentering og kultiveret mælk. Vi beskriver hvordan teknologierne virker, og udlægger den nuværende forskning om dem og de muligheder og udfordringer, de kan have i forhold til fremtidig produktion af mælkebestanddele og deres anvendelse i fødevarer. For præcisionsfermentering præsenterer vi de seneste godt 30 års forskning i mikrobiel syntese af mælkeproteiner, og så ser vi på valg af værtsorganisme, og hvilken betydning dette valg har for anvendeligheden og omkostningerne af de mælkeproteiner, der produceres. For kultiveret mælk, som er et nyere forskningsområde, men baseret på tidligere viden omkring mælkekirtelcellers biologi, ser vi nærmere på de typer af systemer, der er testet, og deres respektive resultater. For begge områder redegør vi derudover for den industrielle aktivitet på områderne, der i høj grad er præget af startups, og vi diskuterer muligheder for effektiv ressourceudnyttelse i produktionen samt overvejelser om godkendelse af disse typer af fødevarer på det Europæiske marked.

