

Использование рекомбинантных белков в современной пищевой биотехнологии: обзор предметного поля

С. Ю. Филькин, А. В. Липкин, А. Н. Федоров

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, г. Москва, Российская Федерация

АННОТАЦИЯ

Введение: С 1994 года динамичное развитие биотехнологии и широкое применение рекомбинантных ферментов привели к новым технологическим решениям в пищевом производстве. Современные технологии позволяют производить сахар, хлеб, пиво, сыр, колбасы и другие продукты с использованием биотехнологических процессов и промышленных пищевых ферментов. Биопродукция рекомбинантных белков заменила природные ферменты, предоставляя ферменты с улучшенными каталитическими функциями, стабильностью и расширенным диапазоном условий функционирования. Использование этих ферментов оказались экономически выгоднее по сравнению с природными и ранее использовавшимися рекомбинантными ферментами.

Цель: Выявить границы предметного поля по исследованию рекомбинантных белков и их роли в современном пищевом производстве за период с 1973 по 2024 гг.

Материалы и методы: Поиск источников осуществляли в базах данных PubMed, PИНЦ и Google Scholar. Методология обзора опиралась на протокол PRISMA-ScR. Хронологические рамки обзора: с 1973 по 2024 г.

Результаты: Первоначальный поиск по ключевым словам позволил выявить 121 источник: 101 в базах данных и 20 из других источников. После удаления дубликатов осталось 113 источников. Оценено 111 полнотекстовых публикаций на приемлемость, в качестве неприемлемых исключены две публикации. Согласно основному массиву исследований, заметна тенденция к использованию модифицированных по физико-химическим и каталитическим свойствам рекомбинантных ферментов. Наблюдается тенденция к увеличению частотности использования рекомбинантных белков, продуцированных методами прецизионной ферментации. Приведены общие сведения о применении рекомбинантных белков в пищевой промышленности. Показана роль рекомбинантных белков в современной пищевой промышленности.

Выводы: Развитие молекулярной биотехнологии позволило создать новые ферменты и белки для нужд пищевой промышленности, расширив их использование в сыроделии, кондитерском производстве и хлебопечении. Существуют вызовы в разработке новых ферментов, экспрессионных систем для биопродукции и биопроцессов с принципиально новыми характеристиками, что приводит к большей экономической целесообразности. Анализ выявил вызовы, связанные с необходимостью соответствия нормативно-правовых актов текущим возможностям и тенденциям в области биопродукции рекомбинантных белков для пищевой промышленности. Полученные результаты могут быть использованы для улучшения каталитических особенностей рекомбинантных ферментов и повышения стабильности ферментных препаратов. Эти результаты полезны для направленной разработки систем продукции рекомбинантных белков и ферментов, увеличения их продуктивности за счет лучшего понимания основных направлений современной индустрии рекомбинантных ферментов для пищевого производства.

Ключевые слова: ферменты, рекомбинантные белки, штаммы-продуценты, регулирование рекомбинантных ферментов, генно-модифицированные организмы, ГМ-продукты, биотехнологии промышленного синтеза белков, биоинженерия белков, генетически-модифицированные источники пищи.

Корреспонденция:

Филькин Сергей Юрьевич

E-mail: s.filkin@fbras.ru

Конфликт интересов:

авторы сообщают
об отсутствии конфликта
интересов.

Поступила: 03.10.2023

Доработана: 30.05.2024

Принята: 15.06.2024

Опубликована: 30.06.2024

Copyright: © 2024 Авторы



Для цитирования: Филькин, С.Ю., Липкин, А.В., & Федоров, А.Н. (2024). Использование рекомбинантных белков в современной пищевой биотехнологии: обзор предметного поля. *FOOD METAENGINEERING*, 2(2), 48-74. <https://doi.org/10.37442/fme.2024.2.46>

Application of Omics Methods in the Study of Endophytic Microorganisms: A Scoping Review

Sergey Yu. Filkin, Alexey V. Lipkin, Alexey N. Fedorov

The Federal Research Centre
"Fundamentals of Biotechnology" of
the Russian Academy of Sciences,
Moscow, Russian Federation

ABSTRACT

Introduction: Since 1994, the dynamic development of biotechnology and the widespread application of recombinant enzymes have led to new technological solutions in food production. Modern technologies enable the production of sugar, bread, beer, cheese, sausages, and other products using biotechnological processes and industrial food enzymes. The bioproduction of recombinant proteins has replaced natural enzymes, offering enzymes with enhanced catalytic functions, stability, and an extended range of operating conditions. These recombinant enzymes have proven to be economically more advantageous compared to natural and previously used recombinant enzymes.

Purpose: To delineate the scope of research on recombinant proteins and their role in modern food production from 1973 to 2024.

Materials and Methods: Sources were searched in the databases PubMed, RSCI, and Google Scholar. The review methodology adhered to the PRISMA-ScR protocol. The chronological scope of the review spans from 1973 to 2024.

Results: The initial search with keywords identified 121 sources: 101 from databases and 20 from other sources. After removing duplicates, 113 sources remained. A total of 111 full-text publications were assessed for eligibility, with two full publications excluded as ineligible. The main body of research indicates a trend towards the use of recombinant enzymes modified for improved physicochemical and catalytic properties. There is a noticeable trend towards the more widespread use of recombinant proteins produced by precision fermentation methods. General information on the application of recombinant proteins in the food industry is provided. The role of recombinant proteins in modern food production is highlighted.

Conclusion: The development of molecular biotechnology has led to the creation of new enzymes and proteins for the food industry, expanding their use in cheese making, confectionery, and baking. Challenges exist in developing new enzymes, expression systems for bioproduction, and bioprocesses with fundamentally new characteristics, leading to greater economic feasibility. The analysis revealed challenges related to the need for regulatory compliance with current capabilities and trends in the bioproduction of recombinant proteins for the food industry. The results obtained can be used to improve the catalytic properties of recombinant enzymes and enhance the stability of enzyme preparations. These findings are useful for the targeted development of recombinant protein and enzyme production systems, increasing their productivity through a better understanding of the main directions of the modern recombinant enzyme industry for food production.

Keywords: enzymes, recombinant proteins, producer strains, regulation of recombinant enzymes, genetically modified organisms, GM products, industrial protein synthesis biotechnology, protein bioengineering, genetically modified food sources

Correspondence:

Filkin Sergey

E-mail: s.filkin@fbras.ru

Conflict of interest:

The authors report the absence of a conflict of interest.

Received: 03.10.2023

Revised: 30.05.2023

Accepted: 15.06.2024

Published: 30.06.2024

Copyright: © 2024 The Authors



To cite: Filkin, S., Lipkin, A., & Fedorov, A. (2024). Application of recombinant proteins in contemporary food biotechnology: A scoping review. *FOOD METAENGINEERING*, 2(2), 47-74. <https://doi.org/10.37442/fme.2024.2.46>

Список сокращений:

ГФС — глюкозо-фруктозный сироп,
LCA — life cycle assessment, оценка жизненного цикла,
GWP — global warming potential, потенциала глобального потепления,
PLA — фосфолипазы A,
PLB — фосфолипаза B,
ЕАЭС — Евразийский Экономический Союз,
FDA — U.S. Food and Drug Administration, Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США,
EFSA — Европейское агентство по безопасности продуктов питания,
GRAS — Generally recognized as safe- «общепризнанно как безопасно», статус выдаваемый FDA для отдельных компонентов.

ВВЕДЕНИЕ

Пищевая промышленность является одной из самых консервативных в отношении стандартов качества продукции, поскольку от данных стандартов зависит здоровье и безопасность народонаселения. Однако, с течением времени, меняются представления о технологиях пищевого производства, как результат, появляются новые технологические решения, в том числе и в пищевом производстве. В связи с бурным развитием биотехнологии с 1990 года по 2024 год на рынке пищевого производства появляются новые технологические решения, такие как рекомбинантные ферменты, продуцируемые генетически-модифицированными организмами (Deckers et al., 2020), рациональный дизайн рекомбинантных ферментов для повышения эффективности (Liu et al., 2024), прецизионная ферментация для продукции заданных рекомбинантных белков (Ashok et al., 2023), и впредь этот процесс будет идти по нарастающей (Siddiqui et al., 2023).

Белки являются природными высокомолекулярными биополимерами, состоящие из отдельных аминокислотных остатков, соединенные между собой пептидной связью. В состав большинство белков входит 20 стандартных аминокислотных остатка, кодируемых при помощи генетического кода. Множественные комбинации аминокислотных остатков позволяют формировать различные белки, а это в свою очередь позволяет белкам выполнять различных функций (TeKaia & Yeramian, 2006). Рекомбинантные белки — это белки,

ДНК которых была создана искусственно. Обычно в качестве организма для продукции рекомбинантных белков выступают либо бактерии (*E.coli*, *B.subtilis*), либо дрожжи (*S.cerevisiae*, *P.pastoris*), либо мицелиальные грибы (*A.niger*, *T.reesei*). Использование микроорганизмов позволяет стандартизировать и масштабировать процессы продукции и очистки рекомбинантных белков (Crowell et al., 2021).

Растущее с 2010 по 2024 годы внимание к проблеме биопroduкции рекомбинантных белков и ферментов у населения усиливает научный интерес и к практическим аспектам геномного редактирования штамм-продуцентов, метаболической инженерии и использованию подходов прецизионной ферментации в пищевой промышленности (Deckers et al., 2020). Рекомбинантные белки подразделяются на три категории (Augustin et al., 2023): ферменты, применяемые в пищевом производстве (Raveendran et al., 2018), белки, меняющие вкус продуктов (Dufossé & Fouillaud, 2019), и белки-аналоги основных белков натуральных продуктов, получаемые в результате ферментации (Linder, 2023).

Внедрение новых методов генетической инженерии (Shankar & Hoyt, 2017), масштабирования ферментационных процессов, выделения и очистки рекомбинантных белков привело к революционным изменениям в производстве рекомбинантных белков (Augustin et al., 2023). Данные изменения затрагивают многие области современной биотехнологии, в том числе и пищевую биотехнологию. Традиционно применяющиеся ферменты из природных источников становятся экономически неконкурентоспособными по сравнению с рекомбинантными ферментами (Adrio & Demain, 2014).

Цель текущего обзора предметного поля — отобразить основные тенденции в области биопroduкции рекомбинантных белков и ферментов. Исследовательские вопросы:

- (1) В каких областях используют ферменты определенных классов (амилазы, протеазы, липазы)? Почему происходит замена природных ферментов рекомбинантными?
- (2) Какие технологические платформы используются для экспрессии рекомбинантных ферментов?
- (3) Какие новые области использования рекомбинантных белков появились?

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Протокол и заявление о прозрачности исследования

Представленный обзор предметного поля выполнен с использованием протокола PRISMA-ScR. Авторы подтверждают, что данная рукопись представляет собой прозрачный, точный и честный отчет о проведенном исследовании.

Критерии отбора

В обзор включены исследовательские статьи и труды конференций, подходящие под критерии отбора. Анализировались статьи на всех языках, ограничений на географию исследования также не было. Критерии отбора источников сформулированы в соответствии с рамкой PCC (Population, Concept, Context) (Таблица 1).

Таблица 1

Критерии отбора источников

Критерий	Включено	Исключено	Причины
Популяция	Создание штаммов-продуцентов рекомбинантных белков и ферментов, используемых в пищевых технологиях.	Создание трансгенных растений и животных, продуцирующих рекомбинантные белки с заданными свойствами; создание методами метаболической инженерии микроорганизмов с заданными свойствами, продуцирующих дополнительные питательные соединения; создание микроорганизмов с измененными свойствами, применяемых в современном виноделии и молочнокислом брожении с целью получить конечный продукт с заданными свойствами.	Фокус исследования направлен на изучение рекомбинантных белков и ферментов, продуцируемых микроорганизмами, в пищевой промышленности.
Концепция	Исследование посвящено белкам и ферментам, применяемым в пищевых технологиях, их классификации, особенностям биопroduкции и их регулированию в различных странах.	Исследование других биотехнологических объектов, применяемых в пищевом производстве (липиды, витамины, сахара).	Целью данного исследования является прояснение вопросов о рекомбинантных белках в пищевом производстве для содействия развития данной отрасли
Контекст	Исследования, направленные на изучение рекомбинантных белков в пищевой промышленности	Исследования, направленные на изучение продуктов других отраслей.	Исследование сфокусировано на изучении работ, посвященных рекомбинантным белкам в пищевой промышленности
Язык	Любой	Нет ограничений	В связи с использованием актуальных источников будут рассмотрены статьи на всех языках.
Временной период	С 1973 года по март 2024 года	До 1973 года	В источниках ранее 1973 года не обнаружено актуальной информации по заданной теме обзора.
География	Любые страны	Нет ограничений	Проблема использования рекомбинантных белков в пищевой промышленности не имеет границ

Также дополнительным критерием являлось наличие доступа к полному тексту статьи. В случае отсутствия такого доступа, полный текст работы запрашивался у авторов, если авторы работ не предоставляли доступ к тексту, то работа исключалась из обзора.

Стратегия поиска

Для поиска в базах данных Pubmed, Scopus и ScienceDirect автор использовал поисковые запросы по ключевым словам: «food enzyme», «food industry», «recombinant protein production», «enzyme», «amylase», «protease», «lipase » с опорой на операторы поиска AND, OR. В контексте поискового запроса использовались фильтры — исключить публикации из следующих предметных областей, «Здравоохранение», «Социальные и гуманитарные науки», «Науки о Земле», «Фармацевтика, токсикология и фармакология». В базы данных РИНЦ был произведен поиск по запросу: (ферменты OR рекомбинантный белок) AND «пищевое производство» OR «регулирование».

Процесс отбора источников

Полученные результаты поиска анализировались и отбирались в соответствии с протоколом PRISMA-ScR. На первом этапе исследования список публикаций, а также информация о них были выгружена в формате .ris и загружены в менеджер ссылок «Zotero», полные тексты статей были загружены в формате .pdf. Далее, список публикаций в «Zotero» был проверен на наличие дубликатов. Обнаруженные дубликаты были исключены. После исключения дубликатов, статьи подвергались скринингу на соответствие критериям отбора в два этапа. Сначала анализ реализовывался по названию и аннотации, а затем по полному тексту. Все прошед-

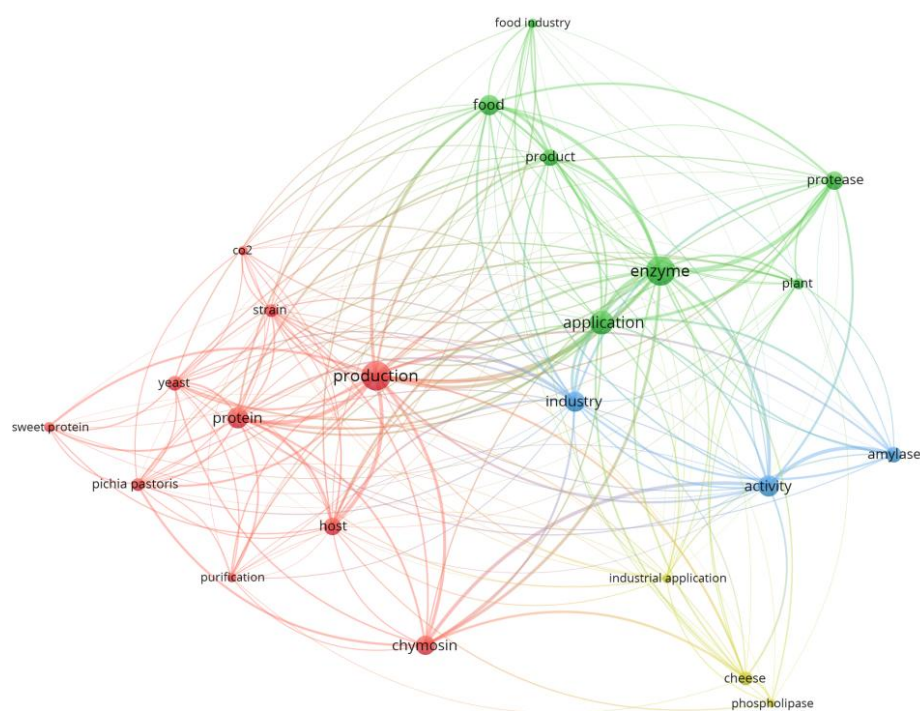
шие отбор публикации далее были включены в обзор предметного поля.

Извлечение и анализ данных

Из отобранных работ была извлечена следующая информация: имена авторов и информация о странах происхождения, цель и дизайн исследования, выводы, год публикации. Все включенные в обзор источники были обработаны в программном обеспечении VOSViewer для наглядного представления частотности встречаемости ключевых слов (Рисунки 1, 2, 3).

Рисунок 1

Частота встречаемости ключевых слов



Примечание. Размер точки определяется частотой встречаемости (чем больше, тем чаще). Цветом и линиями показаны связи между ключевыми словами в исследованиях

Рисунок 2

Частота встречаемости ключевых слов по годам

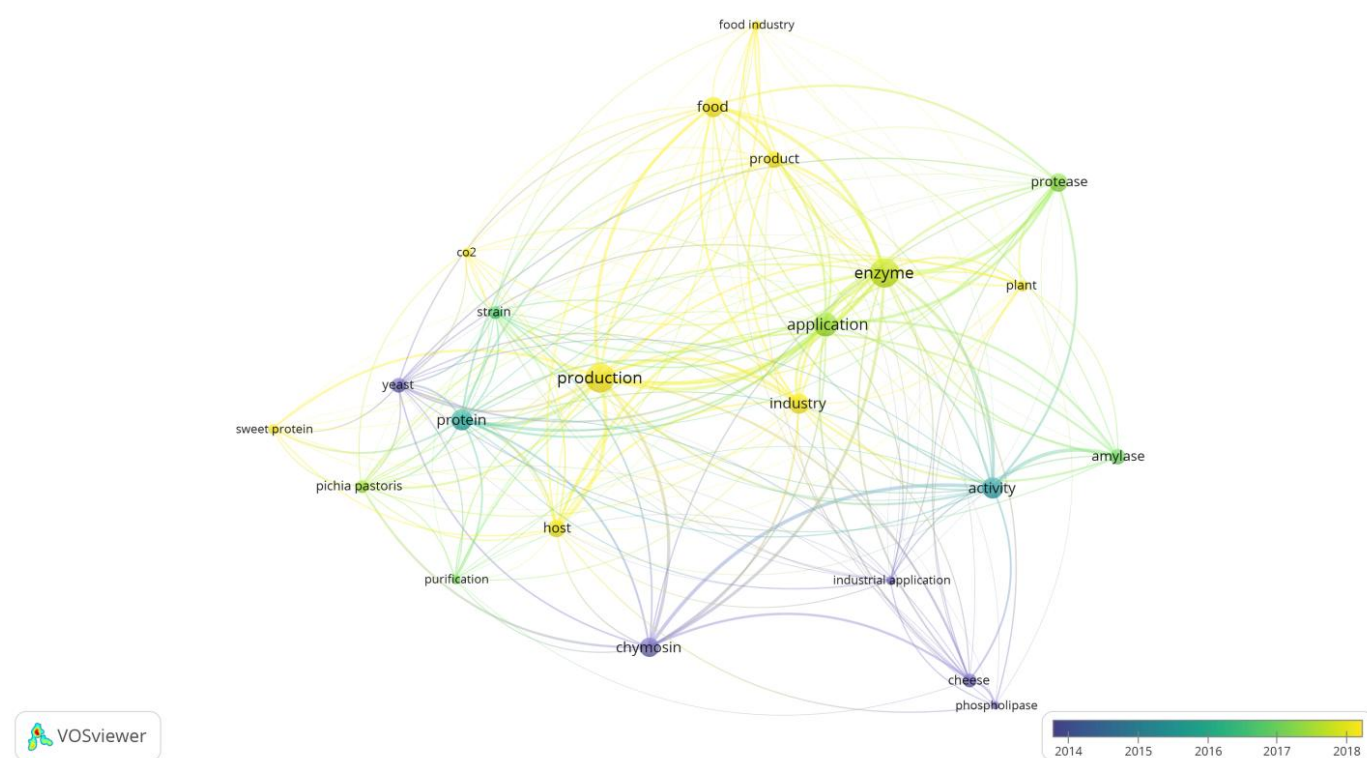
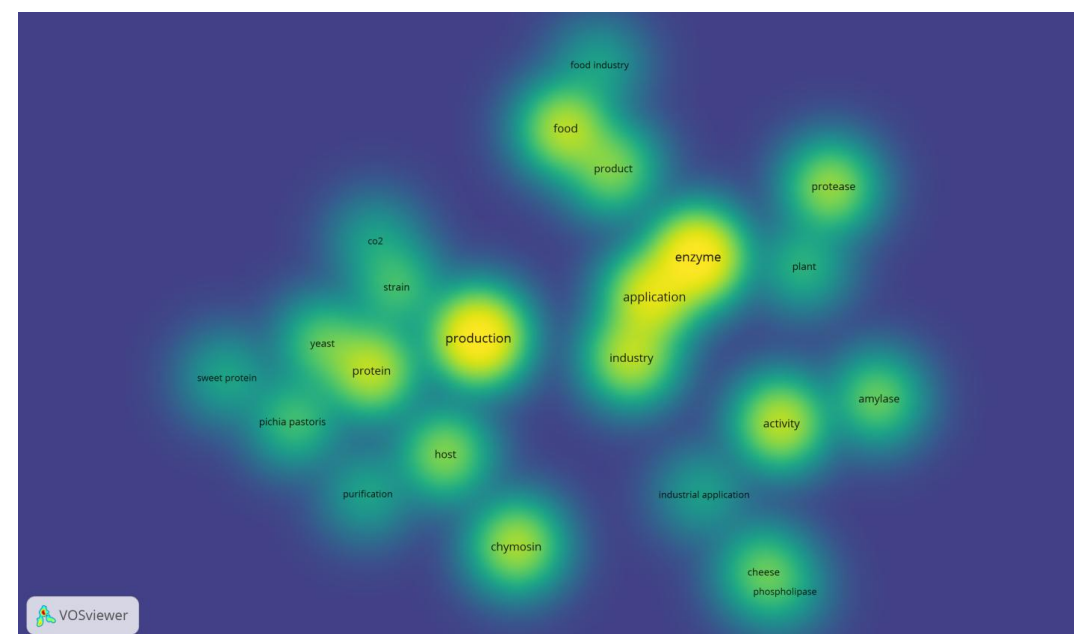


Рисунок 3

Плотность встречаемости ключевых слов



Примечание. Встречаемость ключевых слов показана яркостью и размером круга

С. Ю. Филькин, А. В. Липкин, А. Н. Федоров

РЕЗУЛЬТАТЫ

В данный обзор включено 109 источников. Авторы 22 из них представляют США, 31 автор — из стран Европейского Союза (из них 11 из Германии), 17 авторов из Российской Федерации, 24 автора из стран «Глобального Юга» (из них 10 авторов из Индии, 5 авторов из Китая). 83,5 % источников опубликованы на английском языке, 16,5 % на русском языке.

79,2 % статей опубликованы с 2014 по 2024 год. Больше всего цитирований получили работы 2021 и 2023 годов (13,2 %).

Сеть ключевых слов, созданная при помощи VOSViewer зафиксировала кластеризацию исследований в соответствии с отраслями производства. Так, кластер по слову

«ферменты» разделен на три части: ферменты для сыроделия, амилалитические ферменты, протеазы. Отдельно представлен кластер, связанный с точечной дрожжевой ферментацией: экспрессией различных целевых белков в *Pichia pastoris* и белков-подсластителей в частности.

Ферменты, используемые в пищевой промышленности

Общая характеристика ферментов для пищевой промышленности

Современное производство множества пищевых продуктов невозможно без промышленных пищевых ферментов. Список наиболее востребованных промышленных ферментов приведен в Таблице 2.

Таблица 2

Критерии отбора источников

Кодификационный номер	Пищевой фермент
A.01	α- ацетолактатдекарбоксилаза
A.02	Аминопептидаза
A.1	Амилаза
	(i) β-Амилаза
A.2	Амилаза (maltogenic)
	(i) α- Амилаза (maltogenic)
A.3	Аспаргиназа
B.1	Бычий сычужный фермент
B.2	Бромелаицин
C.01	Карбоксипептидаза Д
	(i) Карбоксипептидаза Д
C.1	Каталаза
C.2	Целлюлаза
C.3	Химозин
C.4	Ципрозин (нат./рекомбинантный)
F.1	Фицин
G.1	Глюкоамилаза
G.2	β-Глюканаза
G.3	Глюкоксидаза
G.4	Глюкоизомераз
G.5	Глутаминаза
H.1	Гемицеллюлаза
H.2	Гексозооксидаза
I.01	Инулиназа
I.1	Инвертаза
L.1	Лактаза
L.2	Липаза

Кодификационный номер	Пищевой фермент
L.3	Липооксидаза
L.4	Лизоцим
M.01	Маннаназа
M.1	Молоко-свертывающий фермент
P.1	Панкреатин
P.2	Папаин
P.3	Пектиназа
	(i) Пектинлиаза
	(ii) Пектинэстераза
	(iii) Полигалактуроназа
P.4	Пентозаназа
P.5	Пепсин
P.5.1	Пероксидаза
P.5.2	Фосфолипаза
	(i) Лизофосфолипаза
P.6	Протеаза
	(i) Кислая пролил-эндопептидаза
	(ii) Термолизин
	(iii) Субтилизин
P.6.1	Протеин-глутаминаза
P.7	Пуллуланаза
R.1	Сычужный фермент
T.01	Трансглутаминаза
T.1	Трипсин
U.1	Уреаза
X.1	Ксиланаза

Примечание. Основан на канадском списке разрешенных пищевых ферментов List of Permitted Food Enzymes. SOR/2012-206 Government of Canada (2023)¹, адаптировано Dekkers et al., 2021.

¹ Government of Canada (2023). List of Permitted Food Enzymes (Lists of Permitted Food Additives).

С. Ю. Филькин, А. В. Липкин, А. Н. Федоров

Ферменты для пищевой промышленности применяют для обработки белков, жиров и углеводов (Dahiya et al., 2020). Для расщепления отдельных белков на мономеры активно используют различные протеазы, для гидролиза сложных углеводов применяют амилазы, глюкоамилазы и другие ферменты, для расщепления липидов и эмульгации жирных кислот и используют липазы и фосфолипазы. Для каждого из этих ферментов требуется оптимизация химической последовательности, подбор экспрессионной системы, штамма-продуцента и условий культивирования клеток, а также разработка способа выделения, очистки, хранения и применения в технологическом процессе (Рисунок 4).

Пищевые ферменты разделяют по характеру катализируемой реакции (гидролазы, эстеразы, оксидазы и др., Таблица 3) (Motta et al., 2023). Другой способ классификации пищевых ферментов основан разделении на отдельные технологические процессы и ферменты, которые в них задействованы. Таким образом, можно проследить основные вехи использования ферментов и спрогнозировать развитие отрасли (Singh et al., 2016) (Таблица 4).

Ферменты в пищевой промышленности повышают скорость технологических процессов, увеличивают выход готовой продукции, улучшают качество продуктов, по-

Таблица 3

Пищевые ферменты по типу катализируемой реакции

Класс	Функции	Подклассы ферментов в продуктах питания
Оксидоредуктаза	Катализируют окислительно-восстановительные реакции	Пероксидаза, полифенолоксидаза, каталаза, липоксигеназа, глюкозооксидаза
Трансфераза	Перенос химических групп от субстрата к молекулам акцепторам (кроме водорода и воды)	Трансглутаминаза
Гидролаза	Катализируют реакцию путем добавления молекул воды, что приводит к разрыву нескольких химических связей	Амилаза, инвертаза, лактаза, липаза, пектиназа, лизоцим, протеазы
Лиаза	Катализирует связывание и разрыв связей, кроме гидролиза или окислительно-восстановительных реакций	Пектинлиаза, пектатлиаза
Изомераза	Катализирует изомеризацию (изомеры: одна и та же молекулярная формула, но разные структурные свойства)	Глюкозоизомераза

Примечание. Адаптировано из Motta et al., 2023.

Рисунок 4

Основные группы промышленных ферментов и направления их промышленного применения



Примечание. Адаптировано из Kaur & Gill (2019).

Таблица 4

Основные отрасли пищевой промышленности и конкретные примеры использования ферментов

Отрасль пищевой промышленности	Фермент	Для чего используется	Штамм-продуцент
Хлебобулочная промышленность	Амилаза	Усиление мягкости хлеба	<i>Aspergillus sp.</i> , <i>Bacillus sp.</i>
	α -амилаза	Увеличение времени хранения хлеба	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
	Ксиланаза	Обминка теста	<i>Aspergillus niger</i>
	Липаза	Обминка теста	<i>Aspergillus niger</i>
	Трансглютаминаза	Приготовление теста	<i>Streptomyces sp.</i>
	Нейтральная протеаза	Стабилизатор лапши	<i>Aspergillus oryzae</i>
Изготовление молочных продуктов	Химозин	Производство сыра	<i>Aspergillus sp.</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i>
	Липазы	Обогащение вкуса и аромат сыра, сокращение срок его созревания	<i>Aspergillus oryzae</i>
	β -галактозидаза	Безлактозные продукты	<i>E.coli</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i>
	Аминопептидаза	Созревание сыра	<i>Lactobacillus sp.</i>
	Каталаза	Созревание сыра	<i>Aspergillus niger</i>
	Трансглютаминаза	Переработка молока, мяса и других видов пищевого сырья	<i>Streptomyces sp.</i>
Производство соков, виноделие и ликероводочная промышленность	Глюкооксидаза	Удаление кислорода для увеличения время хранения пива	<i>Aspergillus niger</i> , <i>P.pastoris</i>
	Целлюлаза	Разжижение фруктов	<i>Aspergillus niger</i>
	Нейтральная протеаза	Осветление вина, пивоварение	<i>Aspergillus oryzae</i>
	β -амилаза	Гидролиз крахмала	<i>Bacillus</i> , <i>Streptomyces</i>
	β -глюканаза	Осветление напитков	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Aspergillus spp.</i>
	Протеаза	Осветление напитков	<i>Aspergillus niger</i>
	Пуллуланаза (амило-альфа-1,6-глюкозидаза))	Осахаривание крахмала	<i>Bacillus sp.</i>
	Наринганаза	Уменьшение горечи цитрусовых напитков	<i>Aspergillus niger</i>
	Лимониназа	Уменьшение горечи цитрусовых напитков	<i>Aspergillus niger</i> , <i>A.oryzae</i>
	Аминопептидазы	Разрушение белка	<i>Lactobacillus brevis</i>
	Пектиназа	Удаление пектина	<i>A.oryzae</i> , <i>Penicillium funiculosum</i>

Примечание. Адаптировано из Singh et al., 2016.

звolyаюот сэконооить ценное сырье и снизить количество отходов (Borrelli & Trono, 2015). Ферментные препараты подразделяются на ферменты природного (растительного и животного происхождения) и искусственного (рекомбинантного) происхождения (Robinson, 2015). Ферментные препараты животного происхождения получают из органов и тканей сельскохозяйственных животных. Например, сычужный фермент, представляющий из себя смесь 70 % химозина и 30 % пепсина, используется в сыроделии (Kumar et al., 2010).

Природные препараты растительного происхождения получают при отжиме сока из различных частей растений. Так, протеазы папаин и бромелаин получают из млечного сока дынного дерева *Cárica paráya* и сердцевины плодов ананаса *Ananas comosus* соответственно (Fernández-

Lucas et al., 2017). Ещё одним широко распространённым ферментным препаратом является фицин из стеблей и листьев финикового дерева *Ficus insipida* (Aider, 2021). Бромелаин представляет собой смесь четырех отличных протеаз. Папаин, фицин и бромелаин активно в процессах тендеризации мяса, а также других процессах в пищевой промышленности (Arshad et al., 2014).

Используются и специальные штаммы микроорганизмов, бактерий, мицелиарных грибов, дрожжей (Cairns et al., 2018). Рекомбинантные ферменты выращивают в искусственно созданных микроорганизмах, рекомбинантные ферменты не отличаются от натуральных. Природные штаммы для получения ферментов стали использовать в конце XIX века. Первые искусственные микроорганизмы для продукции ферментов стали по-

лучать сначала селекционными, а затем и генно-инженерными методами (Ashok et al., 2023).

Использование ферментов в пищевой промышленности имеет множество плюсов: ферменты повышают эффективность технологических процессов при производстве продуктов питания, увеличивают объем выхода готовой продукции, улучшают органолептические свойства продукта (вкус, запах, консистенция, окраска, внешний вид и т.д.) (Solanki et al., 2021). Чем больше фермента необходимо, тем выше эффективность именно биотехнологического процесса с применением микроорганизмов. Так, например, для производства сычужного фермента традиционным способом необходимо экстрагировать химозин из сычуга телёнка (примерно 10 кг сычужного фермента с одного телёнка, необходимо несколько месяцев интенсивного труда, чтобы вырастить и накормить телёнка). В то же время 1000 л ферментер с штаммом-продуцентом рекомбинантного химозина *Bacillus subtilis* даст продукцию 20 кг фермента за 12 ч (Robinson, 2015). Таким образом применение рекомбинантных микроорганизмов предпочтительно не только с экономической стороны вопроса, но и с этической.

Создание каждого штамма-продуцента имеет определенный постоянный шаблон: выбор экспрессионной модели, подбор вектора для экспрессии целевого гена, отбор отдельных клонов, выбор оптимальной схемы очистки (Spohner et al., 2015). И в то же время каждая отдельная разработка уникальна — так как она зависит от физико-химических свойств фермента и его функции (Robinson, 2015). Для отдельного технологического процесса важен не только уровень продукции рекомбинантного фермента, но и эффективность, масштабируемость и дешевизна применяемого способа очистки. Чем больше необходимо производить отдельного фермента, тем более недорогим и неприхотливым должен быть биотехнологический процесс (Khootama et al., 2018). Для соблюдения этих требований постоянно происходит и улучшение самого штамма-продуцента и ферментационного процесса и генно-инженерное улучшение самого рекомбинантного белка за счет изменения его каталитических функций, специфичности за счет методов белковой инженерии (Liu et al., 2019). Один и тот же рекомбинантный фермент может применяться в разных отраслях пищевого производства. Так, α -амилаза применяется в производстве глюкозо-фруктозного сиропа, хлебобулочной промышленности и при производстве соков (Faroog et al., 2021).

Многие из перечисленных выше рекомбинантных белков применяют не по отдельности, а используют для получения комплексных решений в области пищевых технологий. Так, уже существуют смеси ферментов для эмульгирования жиров яичного желтка, осветления вина и фруктовых соков, для пивоваренной промышленности, готовые смеси ферментов для вызревания сыра, и хлебобулочной промышленности (De Maria et al., 2007). Использование готовых стратифицированных смесей ферментов позволяет стандартизировать рецептуры и лучше следить за контролем качества конечного продукта. Так же есть некоторое различие и в микроорганизмах, которые используются для продукции рекомбинантных белков для пищевой промышленности (Deckers et al., 2020).

Бактериальные системы для продукции — наиболее неприхотливые и недорогие. Однако, из-за отсутствия сложной эукариотической системы фолдинга, в бактериальных системах могут продуцироваться далеко не все белки, а наиболее простые белки (Baeshen et al., 2015). Также бактериальные системы не могут продуцировать белки с пост-трансляционными модификациями, например гликопротеины. С точки зрения очистки, они продуцируют большое количество побочных белков, таким образом, рекомбинантные белки из бактерий могут требовать более сложной очистки (Jia & Jeon, 2016). Обычно в качестве бактериальных систем для продукции рекомбинантных белков используют *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*. Для *E.coli* существует больше различных молекулярно-биологических инструментов, однако штаммы рода *Bacillus* дают больший выход по рекомбинантному белку. В частности, штаммы рода *Bacillus* используются для продукции α -амилазы и различных протеаз (Vojnovic et al., 2024).

В качестве экспрессионной системы используются мицелиарные грибы *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, и *Trichoderma reesei*. Они позволяют получить высокие выходы рекомбинантных белков, особенно если исходный фермент также экспрессировался в грибах (Meyer et al., 2015). Они имеют эукариотическую систему фолдинга, однако более сложны в обращении, а также выделяют множество побочных продуктов при культивировании, что усложняет очистку. В данной экспрессионной систем получают липазы, глюкооксидазу и множество других ферментов (Meyer, 2008).

В качестве потенциальной платформы для производства рекомбинантных ферментов всё больше

возрастает роль дрожжевых систем (Spohner et al., 2015). Наличие сильных промоторов, возможность продуцировать рекомбинантный белок в относительно чистом виде, высокий уровень экспрессии рекомбинантных белков, эукариотическая система фолдинга и гликозилирования — всё это преимущества системы экспрессии *P.pastoris*. Именно эту систему экспрессии используют для получения рекомбинантных ферментов, таких как инулаза (Zhang et al., 2004), лакказы (Püllmann & Weissenborn, 2021), лактаза (Bankefa et al., 2022; Sun et al., 2017), и фитаза (Herrera-Estala et al., 2022).

Совокупный мировой рынок промышленных ферментов оценивается в 7,4 млрд. долларов США на 2023 год и этот рынок растет в среднем на 6,6 % в год¹. По итогам 2022 года мировой рынок сывороточного белка оценивался в \$19,6 млрд., а к 2032 году, по прогнозам, достигнет \$40,3 млрд.² При этом растет спрос на безлактозный белок. Ученые утверждают, что непереносимость лактозы есть у 68 % населения Земли (Bayless et al., 2017).

Основные производители на мировом пищевом рынке это: Novozymes (Дания), BASF (Германия), DSM (Нидерланды), Epigen Labs (ОАЭ), Du Pont (США), Tex Biosciences (Индия), Chr.Hansen (Дания). Основными игроками на российском рынке пищевых ферментов являются иностранные компании: Barentz Group, Chr Hansen, Kerry Group, Cargill Inc и ADM. Ожидается, что российский рынок пищевых ферментов будет расти в среднем на 5,3 % в течение прогнозируемого периода с 2020 по 2025 год³.

Производство глюкозо–фруктозного сиропа. Амилаза, глюкоамилаза

Сахар и продукты, содержащие сахара (мед, фрукты), всегда были частью рациона питания человека. Сахароза выступает в качестве основной меры вкуса сладкого. Однако, промышленное производство сахарозы из сахарного тростника и свеклы сталкивается с рядом технических сложностей: необходимо избавиться от примесей, а затем рафинировать полученный сахарный сироп.

Глюкозо–фруктозный сироп (ГФС) — жидкий подсластитель, который используется в производстве множества продуктов и напитков. ГФС — самое крупное технологическое производство в пищевой индустрии и непревзойденный триумф биотехнологии. Ежегодно в мире производится 20 млн. тонн ГФС⁴. Созданная технология способна производить такие фантастические объемы продукции. В качестве сырья для производства ГФС используется чаще всего кукуруза. В Европе (в т.ч. РФ) используется пшеница и картофельный крахмал. Самые ранние разработки по ферментативному производству ГФС относятся к началу 1960-х годов в Японии с последующим выходом на промышленные масштабы в конце 1960-х годов. Рост использования ГФС в пищевой промышленности продолжается уже более 35 лет и является одним из наиболее успешных проектов (White, 2008).

Для производства ГФС важно то, что он является альтернативной сахарозе. Глюкозо–фруктозный сироп стабилен в жидком виде, его можно использовать в кислых продуктах. Технологию производства ГФС разработали в Японии, но начали активно применять в США для стабилизации цен на сахар. В качестве основного сырья для его производства использовалась кукуруза, что позволило стабилизировать и сильно снизить цену на сахарный сироп, а США стать независимой от поставок сахарного тростника из Южной Америки (Ballinger, 1978).

Использование ГФС так же безопасно, как потребление сахарозы, глюкозы и фруктозы, и не оказывает негативного влияния на здоровье, за исключением воздействия на зубы (Glinsmann et al., 1986). Вопросы влияния ГФС на ожирение и состав микрофлоры, а также регулирование его потребления относятся к ответственности потребителей и диетологов, а не контролирующих органов (Bray et al., 2004).

Процесс производства ГФС подразумевает использование как минимум трех различных ферментов для производства конечного продукта — амилазы, глюкоамилазы, глюкоизомеразы (Рисунок 5).

¹ Formulation and Region — Global Forecast to 2028. (2023) Industrial enzymes markets by type (Carbohydrases, Proteases, Lipases, Polymerases, Nucleases). <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/industrial-enzymes-market-237327836.html>

² Shahbandeh M. (2023) Value of the whey protein market worldwide from 2022 to 2032. <https://www.statista.com/statistics/728005/global-whey-protein-market-size/>

³ Mordor intelligence. (2023) Анализ размера и доли рынка пищевых ферментов в России — тенденции роста и прогнозы (2023 — 2028 гг.). <https://www.mordorintelligence.com/ru/industry-reports/russia-food-enzymes-market>

⁴ Bode J. W. (2018). Corn Refiners Association Industry Overview 2017. <https://corn.org/wp-content/uploads/2018/04/CRA-Industry-Overview-2017.pdf>

С. Ю. Филькин, А. В. Липкин, А. Н. Федоров

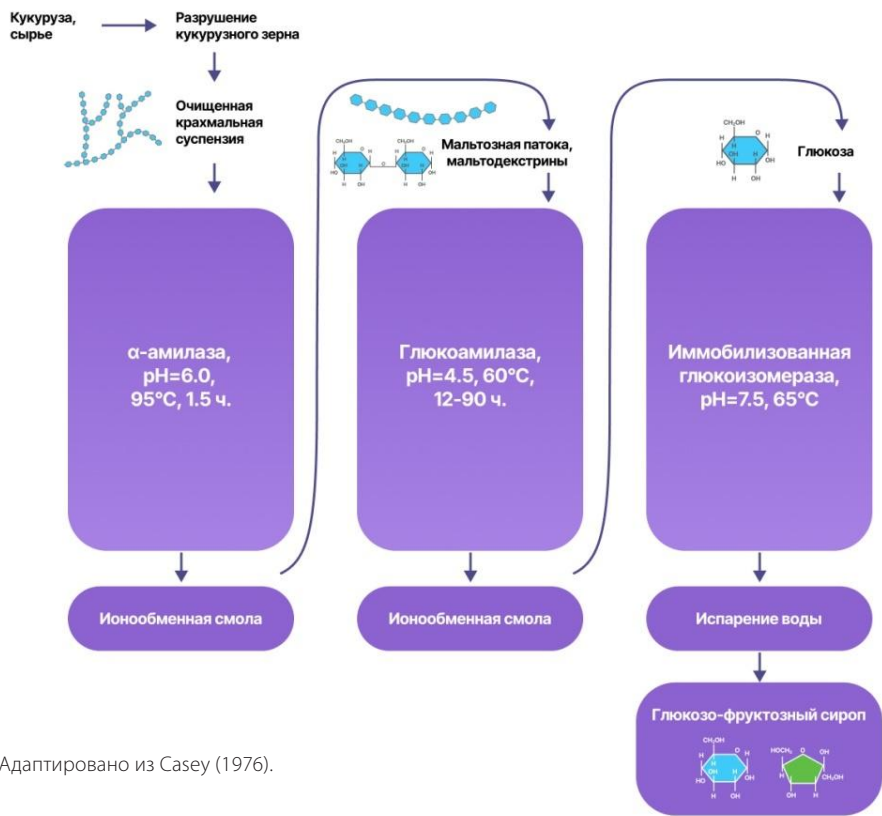
Сначала кукурузные зерна очищают от посторонних примесей. Очищенную кукурузу вымачивают в теплой воде в присутствии SO_2 , затем размягченные зерна измельчают для получения крахмальной суспензии. Полученный крахмал расщепляется под действием иммобилизованной альфа-амилазы на более короткие олигосахариды. Под действием второго фермента глюкоамилазы происходит расщепление на моносахариды и глюкозу. Полученный раствор деминерализуют при помощи ионно-обменной смолы. А за тем пропускают через иммобилизованную

глюкоизомеразу, которая позволяет получить сироп в конечной композиции (HFCS 42; 50–52 % глюкозы, 42 % фруктозы) (Bhosale et al., 1996) (Таблица 5).

Все три фермента, используемых в этом процессе — α -амилаза, глюкоамилаза, глюкоизомераза — рекомбинантные белки, получаемые микроорганизмами. α -амилаза занимает 25–30 % всего рынка рекомбинантных ферментов (Singh et al., 2022).

Рисунок 5

Схематическое изображение ферментативных стадий при производстве глюкозо-фруктозного сиропа (ГФС)



Примечание. Адаптировано из Casey (1976).

Таблица 5

Углеводный состав основных подсластителей

Компонент	HFCS-42	HFCS-55	Кукурузный сироп	Фруктоза	Сахароза	Инvertи- рованный сахар	Мёд
	%	%	%	%	%	%	%
Фруктоза	42	55	0	100	50	45	49
Глюкоза	53	42	100	0	50	45	43
Другие	5	3	100	0	0	10	5
Содержание влаги	29	23	20	5	5	25	18

Примечание. Адаптировано из White (2008).

Амилаза была открыта в Санкт-Петербурге Готтлиб Константином Сигизмундовичем Кирхгофом в 1811 году в результате наблюдения за деградацией крахмала. Эрхард Леуч в 1833 году описал наличие в слюне «птиалина», участвующего в гидролизе крахмала. В 1833 году французские химики Пайен и Персо выделили амилазу и назвали ее «диастаза». В 1894 Дзёкити Такаmine получил патент на способ промышленной продукции амилазы из *Aspergillus oryzae* (первый фермент из микроорганизмов в США). В 1925 Кухн ввел в оборот термин α -амилаза (Singh et al., 2022).

Со времени начала использования ферментативной технологии производства глюкозо-фруктозного сиропа, произошло множество качественных изменений: оптимизировались каталитические активности амилазы, глюкоамилазы и глюкоизомеразы, разработана технология иммобилизации глюкоизомеразы, позволяющая тратить меньше фермента в каталитическом процессе. Однако главная проблема так и не решена: все три фермента катализируют реакцию в разных условиях, при разных температурах и разном pH. Именно это делает необходимым условием использования огромного количества ионообменных смол в многотонном производстве (Bessler et al., 2003).

Решение прикладной биотехнологической проблемы — приведение каталитических условий трех ферментов к единому формату за счет рациональной белковой инженерии позволит удешевить производство ещё сильнее и сделать его более экологически ответственным. Данная нерешенная проблема еще ждёт своего часа.

Липазы, фосфолипазы и потребность в ферментах для эмульгации

Липазы и фосфолипазы имеют важное значение для пищевой промышленности (Fernandes, 2010; Filkin et al., 2020). Наиболее типичные области использования липаз — производство пищевых масел, молочных продуктов и хлебобулочных изделий или эмульгаторов (De Maria et al., 2007; Raveendran et al., 2018; Алексеенко & Предыбайло, 2008). Использование секретируемой фосфолипазы A2 из свиной поджелудочной железы или ядов змей имеет давние традиции в производстве яичного желтка для эмульгирования в майонезе, соусах, хлебопекарной промышленности или очистке растительных масел (De Maria et al., 2007).

В 2024 году коммерческие продукты, содержащие фосфолипазы A2, можно найти под разными торговыми названия-

ми: (1) Lecitase® 10 L (Novozyme A/S, Denmark) — фосфолипаза животного происхождения (из свиной поджелудочной железы), изначально разработанная для дегуммирования растительных масел; (2) микробные фосфолипазы Rohalase® MPL (AB Enzymes, Germany) и Maxapal®A2 (DSM Food Specialties, The Netherlands) из штамма *A. niger* для улучшения эмульгирующих свойств яиц и яичного желтка; (3) микробные фосфолипазы в смеси ферментов CakeZyme® и BakeZyme® DMS Food Specialties (The Netherlands) для пекарных целей (Filkin et al., 2020).

Наиболее распространенными штаммами для крупнотоннажного производства являются *Streptomyces sp.* и экспрессионная система *A. niger*. Эти штаммы занимают 80 % всего производственного рынка дегуммирования масла (Borrelli & Trono, 2015). Ферменты могут использоваться повторно или иммобилизоваться, что повышает выход продукта и снижает эксплуатационные затраты. Поэтому использование фосфолипаз в масличной промышленности представляется привлекательной альтернативой используемой традиционной методике дегуммирования (Khamies et al., 2024). Использование фосфолипаз для промышленного дегуммирования растительного масла позволяет снизить расход воды и снизить выброс CO₂ в атмосферу на 12000 тонн CO₂ ежегодно (Borrelli & Trono, 2015).

Хлебопекарная промышленность

Ещё одной перспективной областью использования липаз является хлебопекарная промышленность. Для преодоления трудностей с переработкой, низкими объемами и неприемлемым качеством сырья используют различные способы улучшения эмульгации, в том числе и внесение ферментов типа амилаз, оксидаз, гемицеллюлаз и протеаз в процессе приготовления теста (Fraatz et al., 2014). Среди всех ферментов, используемых в пищевой промышленности, треть идет на нужды хлебопекарной промышленности (Casado et al., 2012).

В составе теста относительно небольшое количество липидов (2–2,8 % сухого вещества в пшеничной муке), однако они сильно влияют на стабильность пузырьков воздуха в составе теста, что объясняется их способностью образовывать липидные монослои на границе фаз газ/жидкость, тем самым увеличивая воздушность теста. К сожалению, это количество липидов недостаточно для существенного влияния на качество теста и конечных продуктов. Поэтому для обеспечения качества продуктов и увеличения срока хранения хлебобулочных изделий необходимы экзогенные

липиды или эмульгаторы. Эти вещества способствуют стабилизации пузырьков воздуха, что приводит к увеличению объема хлеба, усилению клейковины, укреплению структуры и увеличению срока хранения (De Maria et al., 2007).

Еще одна важная отрасль использования липаз — переработка молочных продуктов для улучшения стабильности жиров или увеличения выхода сыра, масла и мороженого. Традиционные способы применения ферментов включают ускорение процесса созревания сыра или производство липолизированного молочного жира для использования в качестве ароматизатора в сливочном масле, кофе, сыре или шоколаде (Ardö, 2021).

Молоко представляет собой сложную дисперсию, основной составляющей которой является вода. Так же в состав молока входят белки, жиры, углеводы и различные соли. Липиды присутствуют в виде дисперсных капель, стабилизирующих глобулы с молочным жиром, препятствуя коагуляции. При изготовлении сухого молока молекулы фосфолипидов покрывают частицы порошка, улучшая термостабильность восстановленного молока, а мороженому (являющемуся пеной или эмульсией, включающей кристаллы льда и незамерзшую фракцию с белками) фосфолипиды придают дополнительный объем и устойчивость (Rathnakumar et al., 2023).

В производстве сыров типа моцарелла использование коммерческого продукта YieldMAX® компании Novozymes A/S, состоящего из фосфолипидов типа PLA1, PLA2 и PLB, увеличило выход сыра на 0,7–3,8 %. Эмульгирующие свойства лизофосфолипидов в составе сыра выше, чем у фосфолипидов, вследствие чего большее количество молочного жира и белков захватывалось сырной массой, а не оставалось в сыворотке. Кроме того, было показано, что использование фосфолипидов в производстве сыров с пониженным содержанием жира (<5 % в сухом веществе) также способствует увеличению выхода продукта (Lilbaek et al., 2006).

Другой липазный препарат FoodPro CLEANLINE от Danisco A/S обладает активностью ацилтрансферазы, катализируя перенос ацильных групп из sn-2 позиции холестерина молока, что приводит к образованию лизо-фосфолипидов и сложных эфиров. Эти лизофосфолипиды имеют высокую поверхностную активность, что приводит к уменьшению количества продуктов тепловой обработки молока (карамелизованных белков) на стенках емкостей, то есть, к уменьшению затрат на их очистку (Берестова et al., 2014).

Обработка яичного желтка

Эмульсии составляют отдельный класс дисперсных систем, образованных из двух несмешивающихся жидкостей, одна из которых распределена в другой в виде мельчайших капелек. В зависимости от того, какая фаза находится в диспергированном состоянии, различают прямую (масло-вода) и обратную (вода-масло) эмульсии. По концентрации дисперсной фазы эмульсии подразделяют на разбавленные, концентрированные и высококонцентрированные. Желток яйца является хорошим эмульгатором. Эмульгирующую способность, а, следовательно, и потребительские свойства, можно увеличить, предварительно обрабатывая его препаратами фосфолипазы A2 (Karray et al., 2012).

Химозин и варианты его постепенного улучшения

Химозин — аспартатная эндопептидаза, которая катализирует расщепление пептидной связи Phe105-Met106 к-казеина. Химозин является основной частью ферментного комплекса сычуга и на протяжении тысячелетий используется в сыродельной промышленности. Долгое время его получали натуральным образом из сычуга молодых телят, которые измельчали и промывали солью. Полученная таким образом смесь ферментов на 70 % состоит из химозина и на 30 % из пепсина (Kumar et al., 2010).

Впервые промышленная методика очистки химозина была представлена в 1874 году Кристианом Хансенom. С тех пор химозин стал одним из наиболее охарактеризованных белков. В 90-х годах были разработаны методики производства рекомбинантного химозина быка с использованием грибов *Aspergillus niger* и дрожжей *Kluyveromyces lactis* (Bodie et al., 1994). Хотя для производства используется генетически модифицированный организм, в конечном продукте сыроделия отсутствует чужеродный генетический материал. Доля рекомбинантного химозина в мировом производстве продолжает расти (Kumar et al., 2010).

С 2004 года ведется интенсивная работа над улучшением физико-химических свойств рекомбинантного химозина методами рациональной белковой инженерии. Широкое применение нашел рекомбинантный химозин верблюда, отличающийся повышенной термостабильностью и специфичностью к к-казеину (Kappeler et al., 2006). На основе этого химозина были разработаны еще более специфичные и стабильные его варианты (Jaeckel et al., 2016; Пушкарев et al., 2023).

Трансглютаминаза

Ещё одним направлением применения рекомбинантных ферментов для нужд пищевой промышленности — использование ферментов для процессинга мяса: с одной стороны тендеризация мясного сырья (проводится при помощи папаина и других протеаз) (Махова et al., 2019), с другой — использование сшивающих агентов для формирования цельных полимерных структур. Для этого используется трансглютаминаза (Abril et al., 2023).

Трансглютаминаза принадлежит к классу аминотрансфераз и катализирует реакцию переаминирования, перенос ацильных групп между γ -карбоксиамидной группой с формированием пептидной связи между боковыми цепями глутамина и различными первичными аминами. ϵ -амино группы лизиновых оснований приводят к формированию ϵ -N-(γ -глутамил)-лизиновых связей. Трансглютаминаза встречается в различных эукариотах и прокариотах, включая трансглютаминазу mTG из *Streptomyces sp.* (Martins et al., 2014).

Японцы с XII века использовали рыбную массу для формирования рыбных палочек — сурими. Эта рыбная масса содержит природную трансглютаминазу, формирование сурими считается классическим способом использования трансглютаминазы в пищевой промышленности (Petcharat & Benjakul, 2018). Однако с течением времени её стали шире использовать в пищевой промышленности. Сегодня трансглютаминаза используется для улучшения текстуры мяса, молочных продуктов, текстуры и эластичности конфет, в хлебобулочной промышленности для эмульгации глютена (Багрянцева et al., 2021).

Начиная с 2010 года появляется всё больше и больше информации о потенциальном вреде использования трансглютаминазы в хлебобулочной промышленности. Так, её использование увеличивает иммуногенность глютена, и, по всей видимости, приводит к развитию аутоиммунных заболеваний, цеакилии (Lerner & Benzvi, 2021).

Микробная трансглютаминаза разрешена для использования в США (разрешение FDA от 2002 года), в Европейском Союзе (EU Regulation No 1169/2011 dated 25 October 2011 с уведомлением на этикетке, что продукт «сформирован, реструктурирован») (Lerner & Benzvi, 2021). В соответствии

с техническим регламентом ТС 029/2012 «Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств» трансглютаминаза не разрешена на территории ЕАЭС¹.

Однако, ежегодно в РФ ввозится 600 тонн препарата микробной трансглютаминазы². Этот фермент встречается в российских продуктах (по данным Роспотребнадзора), он используется в пищевом производстве, но при этом утвержденных и аккредитованных методик определения активности в конечном продукте нет.

Использование белков в качестве вкусовых добавок

Начиная с 2010-ых гг. появились идеи о возможном использовании белков в качестве пищевых добавок, меняющих вкус. Более всех из них привлекают внимание так называемые сладкие белки (Joseph et al., 2019). В группу сладких белков относят небольшие белки размером в 6–22 кДа растительного происхождения, впервые обнаруженные в 70-х годах: тауматин, монелин, браззеин, пентадин, мабинлин, куркулин (Таблица 6).

Тауматин был охарактеризован первым из плодов дерева катемфе (*Thaumatococcus daniellii*). Использование природного натурального тауматина началось в 1970-х годах для изготовления подсластителя. Наибольших успехов удалось добиться при экспрессии рекомбинантного тауматина в метилотрофных дрожжах *P. pastoris* (Healey et al., 2017). На текущий момент рекомбинантный тауматин разрешен в США в качестве искусственного подсластителя в мороженом, жевательной резинке, еде для животных и прочих продуктах (Kelada et al., 2021). Браззеин обладает меньшим размером, что делает его более удобным объектом для рекомбинантной продукции (Bilal et al., 2022). Кроме того, показан ряд замен, позволяющих усилить сладкий вкус браззеина в 18 раз (H31R, E36D, E41A) (Lee et al., 2013).

Получает распространение и использование рекомбинантного миоглобина для того, чтобы придать вкус говяжьего мяса для искусственного мясного продукта, основанного на растительных белках сои и гороха (Yu et al., 2023). Компания Impossible Foods производит миогло-

¹ Совет Евразийской экономической комиссии. (2014, September 18). Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 029/2012 Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств. <https://docs.cntd.ru/document/902359401>

² Трансглютаминазация России. 13-й фактор. (2016, August 29). <https://sfera.fm/articles/myasnaya/transglyutaminazatsiya-rossii-13-i-faktor>

С. Ю. Филькин, А. В. Липкин, А. Н. Федоров

Таблица 6

Критерии отбора источников

Белок	Природный источник	Длина пептида в аминокислотных остатках	Относительная сладость, относительно сахарозы	Легальный статус FDA/EFSA	Использование
Тауматин 22 кДа	<i>Thaumatococcus danielli Benth</i> (Катемфе) (фрукты) Западная Африка	Одна полипептидная цепь из 207 аминокислотных остатков с восемью внутримолекулярными дисульфидными связями (мономер)	1,600 x	Утвержден в 2018 г. в качестве подсластителя. В 2020 г.: одобрен в качестве подсластителя и усилителя/модификатора вкуса.	Усилитель вкуса в пищевых продуктах, таких как мороженое, жевательная резинка, молочные продукты, корма для домашних животных, безалкогольные напитки, а также для маскировки нежелательного вкуса в пищевых продуктах и фармацевтических препаратах (Kelada et al., 2021).
Монеллин 10,7 кДа	<i>Dioscoreophyllum Cumminsii diels</i> (ягода Серендипити) (фрукты) / Западная Африка	Две полипептидные цепи: цепь А содержит 44 аминокислотных остатка, цепь В — 50 аминокислотных остатка (димер А+В).	3,000	Нет юридического статуса в США (FDA или EFSA)	Не используется в пищевой промышленности из-за низкой стабильности при нагревании и кислой среде
Браззейн 6,4 кДа	<i>Pentadiplandra brazzeana</i> (фрукты) / Западная Африка	Одна цепь из 54 аминокислотных остатков с восемью дисульфидными связями (мономер)	500–2,000 x	Может использоваться в качестве усилителя вкуса напитков с лимонной кислотой для уменьшения побочного привкуса других подсластителей, таких как стевиозид, ацесульфам-К и аспартам.	Нужно больше исследований, чтобы улучшить вкусовое восприятие
Мабинлин 12,3 кДа	<i>Capparis masaki</i> (китайское растение) (лист и цветок)	Две полипептидных цепи: цепь А, состоящая из 33 аминокислотных остатка, цепь В, состоящая из 72 аминокислотных остатка (димер А + В).	400 x	Не одобрено	
Пентадин 12 кДа	<i>Pentadiplandra brazzeana</i> (фрукты) Африка	Нет данных	500 x	Не одобрено	Модификатор вкуса; можно использовать с сахарином, чтобы замаскировать неприятный горький привкус.

Примечание. Адаптировано из Farag et al. (2022).

бин и гем-содержащие рекомбинантные белки в дрожжах *P. pastoris* (Roy-Chaudhuri & Shankar, 2020). Применение данной технологии одобрено FDA.

Не исключено появления новых вкусовых сочетаний и усилителей вкуса, основанных на новых рекомбинантных белках и пептидах.

Белки-аналоги основных продуктов.
Прецизионная ферментация

Существует серьезная проблема в производстве современных пищевых продуктов, содержащих животные белки. В 2022 году население нашей планеты достигло 8 млрд. человек и продолжает быстро расти. По прогнозам ООН, к 2050 году на Земле будут жить уже 9,7 млрд. человек¹. Однако, чем больше население планеты, тем больше каче-

¹ <https://www.un.org/en/global-issues/population#:~:text=Our%20growing%20population&text=The%20world's%20population%20is%20expected,billion%20in%20the%20mid%2D2080s>.

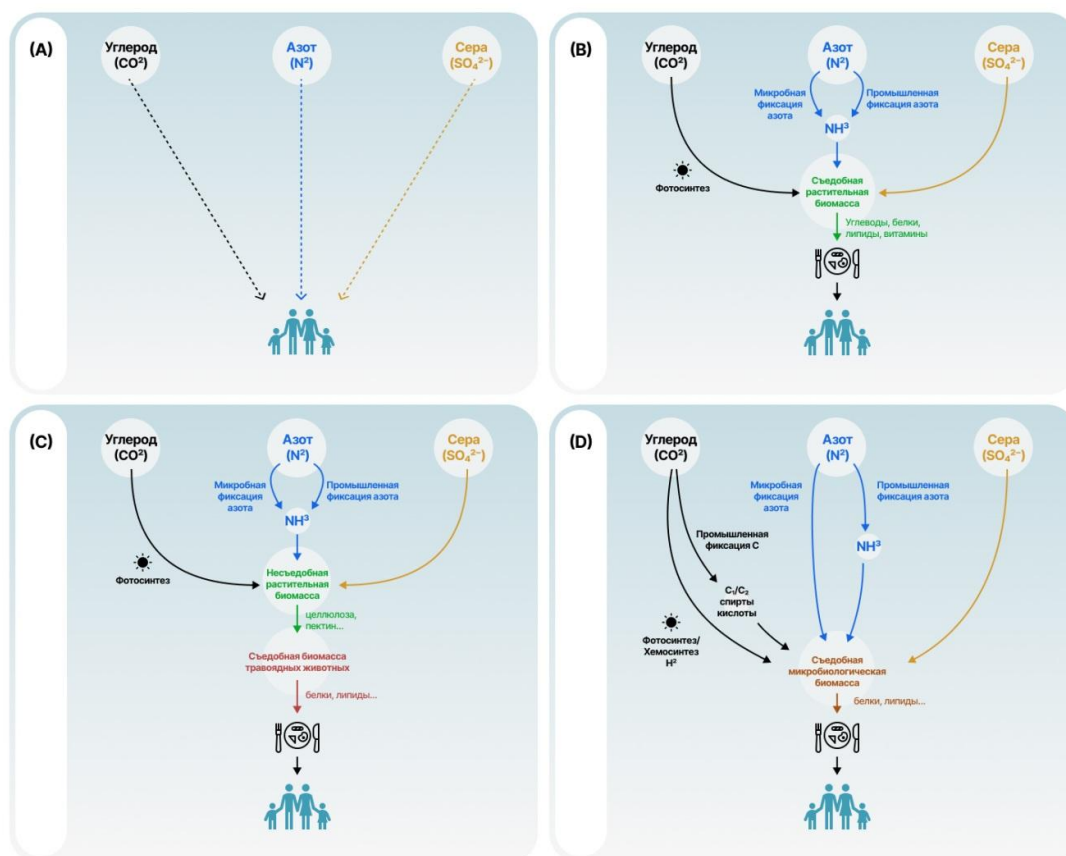
ственной пищи необходимо производить. Человечество постепенно оказываемся в «экологической ловушке» — не хватает пахотных земель, но увеличение агропромышленного комплекса приводит к тому, что в атмосферу и в почву попадает все больше вредных веществ. А они в свою очередь не менее опасны для человека, чем голод. Пищевая промышленность ответственна за треть парниковых выбросов в атмосферу (Cirpa et al., 2021). При этом индустрия производства животного белка требует использования 77 % пахотных земель при продукции 38 % пищевого белка¹.

Какие же технические решения позволят добиться устойчивого развития в пищевом производстве? Фуллер определяет эфемерализацию как способность тех-

нологического прогресса делать всё больше и больше всё меньшими средствами, за счёт введения новых технологий, которые позволяют получать больше отдачи (продукта, услуги, информации) с затратой всё меньшего и меньшего количества исходных ресурсов (усилий, времени, материалов и т.д.) (Fuller, 1973). Эфемерализация в области пищевой биотехнологии сталкивается с проблемой получения недорого животного белка с наименьшими затратами по энергии и антропогенной нагрузке (Linder, 2019). Использование специально сконструированных микроорганизмов для продукции рекомбинантного животного белка — один из потенциальных вариантов снизить антропогенное давление на нашу планету (Рисунок 6).

Рисунок 6

Биокаталитический взгляд на производство продуктов питания и питание человека



Примечание. (А) У людей отсутствует метаболическая способность усваивать наиболее часто встречающиеся в природе неорганические формы углерода (диоксид углерода, CO₂), азота (газообразный азот, N₂) и серы (сульфат, SO₄²⁻). (Б) Съедобные растения позволяют людям косвенно приобретать неорганический углерод, азот и серу. (В) Травоядные животные позволяют людям через посредников получать доступ к питательным веществам из несъедобной биомассы. (Д) Съедобная микробная биомасса позволяет людям приобретать неорганический углерод, азот и серу, но без абсолютной потребности в фотосинтезе. Адаптировано из Linder (2023).

¹ Mridul A. (2023, September 5). 8 Charts That Illustrate the Impact of Food Systems and Our Diets on Climate Change. <https://www.greenqueen.com.hk/stats-charts-facts-climate-change-impact-food-systems-diet-agricultu/>.

С. Ю. Филькин, А. В. Липкин, А. Н. Федоров

Термин «прецизионная ферментация» появился исторически недавно, он описывает процесс биопродукции целевого рекомбинантного белка (или другого биосинтетического продукта) спроектированным микроорганизмом с последующей очисткой для пищевого потребления. Использование этого процесса позволяет сильно сократить потребление водных, энергетических ресурсов и снизить выбросы CO₂ и CH₄ при продукции данных белков (Рисунок 7).

Основные технологии производства рекомбинантного белка для питания (Таблица 7) на данный момент сфокусированы на нескольких белках: овальбумине – основном белке куриного яйца; и основных белках молока β-лактоглобулине, α-,β-,κ- казеинах (Horpenreijis et al., 2024).

Биопродукция рекомбинантного овальбумина в грибах *T. reesei* позволяет получать овальбумин с меньшей нагрузкой на окружающую среду в метриках LCA

(life cycle assessment, или оценка жизненного цикла) и GWP (потенциала глобального потепления) (Järviö et al., 2021). Такая же оценка проведена для рекомбинантного β-лактоглобулина, основного белка сыворотки молока, производимого в *T. reesei* компанией Perfect Day (Рисунок 8) (Geistlinger et al., 2018, 2020). Для производства в грибах *T. reesei* компания имеет разрешение от FDA на производство β-лактоглобулина и его использование в продуктах питания. Рекомбинантный β-лактоглобулин используется в пищевой промышленности широко в качестве добавок в молочные продукты (мороженное, питательные батончики и др.).

Основной конкурент компании Perfect Day — израильская компания Remilk. Помимо рекомбинантного β-лактоглобулина компания производит рекомбинантные казеины по отдельности, очищает их, а затем собирает в казеиновые мицеллы (Wolff et al., 2022). Рекомбинантный β-лактоглобулин производится в метилотрофных

Рисунок 7

Биокаталитический взгляд на производство продуктов питания и питание человека

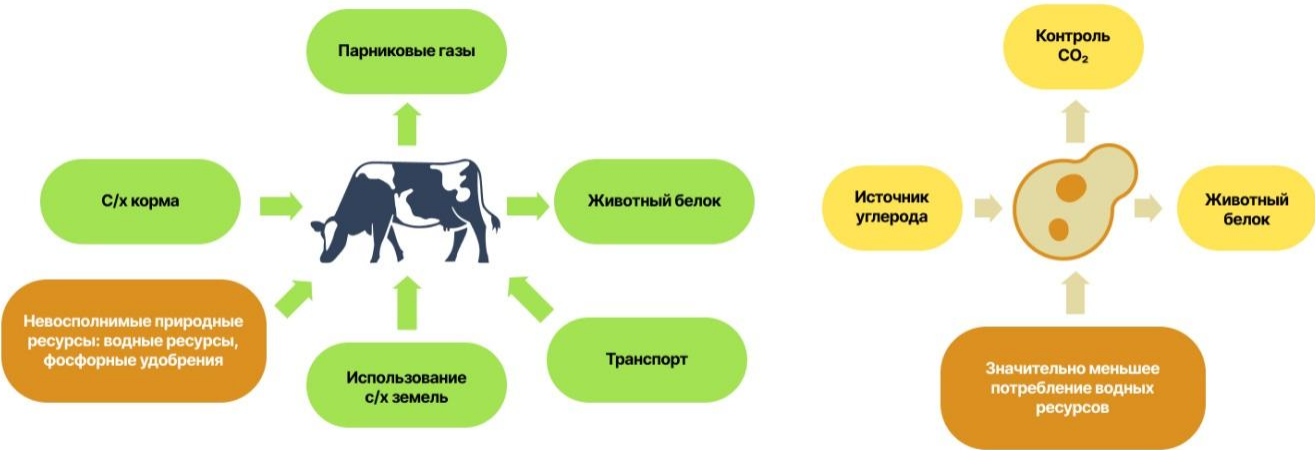


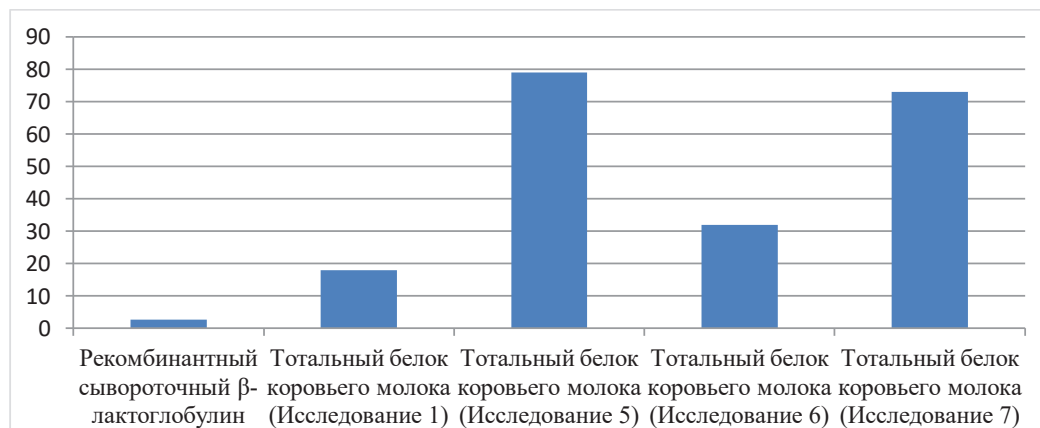
Таблица 7

Примеры продуктов «Прецизионной ферментации»

Компания	Продукт	Источник углерода
EVERY Company	Различные белки куриного яйца	углеводы
Liven proteins	Желатин, коллаген	углеводы
New Culture	Белки молока, казеины	углеводы
OnegoBio	Куриный овальбумин	углеводы
PerfectDay	β-лактоглобулин,	глюкоза
Remilk	Белки молока, β-лактоглобулин, казеины	Метанол, глюкоза
Better Whey («Nestle»)	β-лактоглобулин	неизвестно
TurtleTree	Лактоферрин	неизвестно

Рисунок 8

Оценка уровня потребности ПГП ($\text{CO}_2/\text{кг}$ белка) при производстве рекомбинантного и натурального β -лактоглобулина



Примечание. Perfect Day, Inc. (2021, August 20)¹

дрожжах *Pichia pastoris* уРМК-66². Источником углерода для такого производства может являться как метанол, так и глюкоза, конечный продукт не содержит генетического материала хозяина и уже применяется в пищевой промышленности (соответствует GRAS). Таким образом, удастся получить безлактозное молоко с полностью рекомбинантными белками (Wolff et al., 2022). Использование различных казеинов позволяет получать гипоаллергенное молоко для людей с аллергией на конкретный белок из казеина (Bhatt V. et al., 2021). Помимо рекомбинантного молока также получают сыр моцареллу (Antuma et al., 2024). На конец 2023 года компания получила разрешение на выход на рынок США, Канады и Израиля. Использование дрожжей при производстве рекомбинантного β -лактоглобулина по словам руководства компании позволяет сократить GWP на 97 %, а так же снизить потребление энергии и воды, необходимое для производства белка³ (Behm et al., 2022) (Рисунок 8).

Проблема трансфера пищевых биотехнологий в Российской Федерации

На территории РФ действует несколько регламентирующих актов в отношении рекомбинантных ферментов. Отдельные ГОСТы действуют на ферментные препараты для пищевой промышленности. Однако эти ГОСТы не распространяются на весь список перечисленных выше препаратов, а только на амилазы, молокосвертывающие ферменты⁴, липазы⁵. Остальные препараты (глюкооксидаза, каталаза, трансглутаминаза и др.) находятся в обороте без государственных стандартов, нет единого закона, регламентирующего список разрешенных ферментных препаратов для пищевой промышленности (Кулев, 2014).

Основной закон, который регламентирует требования к ферментному препарату для пищевой промышленности — технический регламент ТС 029/2012 «Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и тех-

¹ Perfect Day, Inc. (2021, August 20). Comparative life cycle assessment of Perfect Day whey protein production to dairy protein. https://perfectday.com/wp-content/uploads/2022/01/Comparative-Perfect-Day-Whey-LCA-report-prepared-by-WSP_20AUG2021_Non-Confidential-1.pdf

² Sylvester, Brian P. (2022, March 4). GRAS Notice for Non-Animal P-Lactoglobulin Whey Protein from Fermentation by *Komagataella phaffii*. <https://www.fda.gov/media/168464/download>

³ Perfect Day, Inc. (2021, August 20). Comparative life cycle assessment of Perfect Day whey protein production to dairy protein. https://perfectday.com/wp-content/uploads/2022/01/Comparative-Perfect-Day-Whey-LCA-report-prepared-by-WSP_20AUG2021_Non-Confidential-1.pdf

⁴ ГОСТ 34353–2017. Препараты ферментные молокосвертывающие животного происхождения сухие. (2018, September 1). <https://docs.cntd.ru/document/1200157890>

⁵ ГОСТ Р 71 139–2023 Ферментные препараты для пищевой промышленности. Метод определения липолитической активности. (2024, January 3).

нологических вспомогательных средств»¹. Несмотря на множественные попытки гармонизировать этот закон под текущее состояние рынка пищевых ферментов, данный закон устарел и не отражает современного разнообразия рекомбинантных ферментов и технологических платформ, используемых для их продукции (Алешков & Каленик 2017; Багрянцева et al., 2016; 2021; Кулев, 2014; Хасанова & Тешаев, 2020).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты позволили выявить усилившийся интерес исследователей к рациональному дизайну рекомбинантных ферментов с измененными каталитическими свойствами (Boukid et al., 2023; Li et al., 2024). Речь идет не только о улучшении непосредственной скорости катализа субстратного превращения ферментом, но и улучшении термостабильности рекомбинантного фермента (Cramer et al., 2018; Jin et al., 2023; Zhu et al., 2023), снижения неспецифической активности (Jaeckel et al., 2019). Шире стали применяться методы системного анализа с использованием моделей машинного обучения для рационального дизайна структуры фермента (Anishchenko et al., 2021).

Выделяется тенденция на использование более высокопроизводительных систем, экспрессирующих рекомбинантные белки, созданных методами геномного редактирования (Li et al., 2022; Salazar-Cerezo et al., 2023; Yang et al., 2024), метаболической инженерии (Meyer, 2021; Peña et al., 2018; Zhang et al., 2023) и с оптимизированным биопроцессом продукции рекомбинантного белка (Fasim et al., 2021; Mayolo-Deloisa et al., 2020; Saad et al., 2023; Yuan et al., 2024). Использование для биопродукции целевых белков GRAS-микроорганизмов облегчает регуляторное сопровождение для выхода таких продуктов на рынок (Augustin et al., 2023). При этом новые технологии биопродукции оптимизированных ферментов делают старые технологии производства ферментов неконкурентоспособными, так как для про-

изводства эквивалентного количества белка требуется меньше материала, энергии и персонала.

Появилось новое направление — прецизионная ферментация для продукции рекомбинантных белков для пищевого производства (Augustin et al., 2023; Teng et al., 2021). В данных работах авторы фокусируются как и на объектах для рекомбинантной экспрессии, так и на системах для экспрессии рекомбинантных продуктов, аспектах связанных с масштабируемой очисткой полученного продукта (Amorim et al., 2021). Приводятся оценки по себестоимости отдельных рекомбинантных продуктов (Hettinga & Bijl, 2022), а так же технико-экономический анализ удельной экологической нагрузки прецизионной ферментации по сравнению с традиционным производством (Behm et al., 2022).

В Российской Федерации в настоящее время нет нормативной базы для производства многих ферментов, применяемых в пищевой индустрии, поскольку технический регламент ТС 029/2012 регулирует список разрешенных продуцентов и самих рекомбинантных белков. Это позволяет существовать парадоксальной ситуации, когда пищевые рекомбинантные ферменты в России нельзя производить, но можно покупать и использовать зарубежные ферменты. Поскольку отличить рекомбинантный фермент от натурального практически невозможно, производство рекомбинантных ферментов в Российской Федерации и странах Евразийского экономического союза оказывается вне закона из-за несовершенства законодательства². Технологическое развитие в области биотехнологии указывает на то, что данная отрасль будет иметь мощное развитие в ближайшее время вплоть до 2040 года³.

В России не все экспрессирующие платформы для продукции рекомбинантных ферментов, произведенные на территории США и ЕС как GRAS (Generally recognized as safe — «общепризнанно как безопасно»), разрешены для использования (Багрянцева, 2020). Так некоторые метилотрофные дрожжи (*P. pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Yarrowia lipolytica*) не разрешены в качестве производящих платформ для пищевой продукции.

¹ Совет Евразийской экономической комиссии. (2014, September 18). Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 029/2012 Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств. <https://docs.cntd.ru/document/902359401>

² Проблема отличия натурального фермента от рекомбинантного, методы выявления и контроля примесей генетических материалов штамма-продуцента — тема отдельного обзора, необходимо рассматривать данную тему за пределами данного обзора. Более подробно данная тематика освещена (Lensch et al., 2022), (Sutay Kocabaş & Grumet, 2019).

³ McKinsey Global Institute (2020, May 13) The Bio Revolution Innovations transforming economies, societies, and our lives. <https://www.mckinsey.com/industries/life-sciences/our-insights/the-bio-revolution-innovations-transforming-economies-societies-and-our-lives>

Кроме того, по законодательству РФ требования к чистоте для рекомбинантных ферментов, применяемых в пищевой промышленности, приравниваются к требованиям, принятым для рекомбинантных медицинских белков¹. Вследствие этого, производителям рекомбинантных ферментов для пищевой промышленности приходится соблюдать необоснованно завышенные требования к чистоте выпускаемых препаратов и к производственным мощностям, что делает производство ферментов неконкурентным.

Необходим закон разрешительного характера, который позволит производить отечественные рекомбинантные белки, не нарушая российского законодательства, с использованием всей мощи современных генетических технологий и с использованием разнообразных современных экспрессионных платформ. Только этот подход позволит производить конкурентные пищевые продукты в XXI веке в достаточном количестве и отвечающим всем нормативным нормам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современная биотехнология — синоним эффективно-го применения ферментативного катализа во многих отраслях пищевой промышленности. Данный обзор отражает использование рекомбинантных белков и ферментов в современной пищевой промышленности. Подробно охарактеризовано использование амилаз, молокосвертывающих ферментов, липаз и трансглютаминазы в пищевой промышленности. Для области использования прочих ферментов (таких как глюкозо-оксидаза, каталаза, β -глюкозидаза и других) в пищевой

промышленности даны общие сведения, более детальный анализ требует отдельного рассмотрения. Вследствие большого числа научных исследований, обзор ограничивается областью исследования биопродукции рекомбинантных белков для пищевой промышленности, однако, область биопродукции витаминов, красителей и липидов методами прецизионной ферментации для пищевой промышленности осталось вне поля данного обзора. Полученные результаты могут быть использованы для анализа направлений развития прикладной биотехнологии в области создания эффективных рекомбинантных белков и их регулирования в правовом поле. Существует потребность в появлении более эффективных исследований и разработок в области производства рекомбинантных пищевых белков. Существует необходимость в приведении нормативных правовых актов России в области пищевого производства в соответствии с новыми технологическими возможностями.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

Филькин Сергей Юрьевич: концептуализация, разработка методологии исследования, работа с программным обеспечением, администрирование данных, написание - подготовка черновика рукописи.

Липкин Алексей Валерьевич: курирование данных, разработка методологии исследования, написание - рецензирование и редактирование рукописи.

Федоров Алексей Николаевич: концептуализация, научное руководство исследованием, визуализация, написание - рецензирование и редактирование рукописи.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Алексеев, А. В., & Предыбайло, А. В. (2008). Переэтерификация масел и жиров. *Молочная промышленность*, 11, 24–24.
- Alekseenko, A. V., & Predybaylo, A. V. (2008). Transesterification of oils and fats. *Dairy Industry*, 11, 24–24. (In Russ.)
- Алешков, А. В., & Каленик, Т. К. (2017). Техническое регулирование инновационной пищевой продукции.

Известия Дальневосточного федерального университета. Экономика и управление, 1(81), 102–112.

Aleshov, A. V., & Kalenik, T. K. (2017). Technical regulation of innovative food products. *The Bulletin of the Far Eastern Federal University. Economics and Management*, 1(81), 102–112. (In Russ.)

¹ Государственный стандарт качества лекарственного средства. Общая фармакопейная статья ОФС 42- «Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК» <https://base.garant.ru/70457452/5c69d3b8fce87cf1b2bd234a0868ed8c/>

- Багрянцева, О. В. (2020). Обоснование необходимости разработки мероприятий по управлению рисками, связанными с использованием пищевой продукции, производимой при помощи микробного синтеза. *Вопросы питания*, 89(2), 64–76. <https://doi.org/10.24411/0042-8833-2020-10017>
- Bagryantseva, O. V. (2020). Justification for the development of measures to manage risks associated with the use of food products produced by microbial synthesis. *Problems of Nutrition*, 89(2), 64–76. (In Russ.) <https://doi.org/10.24411/0042-8833-2020-10017>
- Багрянцева, О. В., Гмошинский, И. В., Шипелин, В. А., Цурикова, Н. В., Шевелева, С. А., Шумакова, А. А., Мусаева, А. Д., Трушина, Э. Н., Мустафина, О. К., Сото, С. Х., Минаева, Л. П., Седова, И. Б., Селифанов, А. В., Соколов, И. Е., Колобанов, А. И., & Хотимченко, С. А. (2021). Оценка рисков для здоровья ферментного препарата - комплекса глюкоамилазы и ксиланазы из *Aspergillus awamori* XYL T-15. *Вопросы питания*, 90(3), 28–39. <https://doi.org/10.33029/0042-8833-2022-91-3-42-52>
- Bagryantseva, O. V., Gmoshinsky, I. V., Shipelin, V. A., Tsurikova, N. V., Sheveleva, S. A., Shumakova, A. A., Musaev, A. D., Trushina, E. N., Mustafina, O. K., Soto, S. Kh., Minaeva, L. P., Sedova, I. B., Selifanov, A. V., Sokolov, I. E., Kolobanov, A. I., & Khotimchenko, S. A. (2021). Health risk assessment of the enzyme preparation - a complex of glucoamylase and xylanase from *Aspergillus awamori* XYL T-15. *Problems of Nutrition*, 90(3), 28–39. (In Russ.) <https://doi.org/10.33029/0042-8833-2022-91-3-42-52>
- Багрянцева, О. В., Хотимченко, С. А., Шевелева, С. А., Минаева, Л. П., & Семенова, П. А. (2021). Об использовании фермента трансглутаминазы в пищевой промышленности. *Пищевая промышленность*, 10, 78–81.
- Bagryantseva, O. V., Khotimchenko, S. A., Sheveleva, S. A., Minaeva, L. P., & Semenova, P. A. (2021). On the use of the enzyme transglutaminase in the food industry. *Food Industry*, 10, 78–81. (In Russ.)
- Багрянцева, О. В., Шатров, Г. Н., & Арнаут, О. В. (2016). Вопросы безопасного использования ферментных препаратов, пищевых добавок и ароматизаторов, полученных методом биотехнологии. *Пищевая промышленность*, 6, 69–73.
- Bagryantseva, O. V., Shatrov, G. N., & Arnautov, O. V. (2016). Issues of safe use of enzyme preparations, food additives, and flavors obtained by biotechnology. *Food Industry*, 6, 69–73. (In Russ.)
- Берестова, А. В., Зинюхин, Г. Б., & Межуева, Л. В. (2014). Особенности технологии пищевых масложировых эмульсий функционального назначения. *Вестник Оренбургского государственного университета*, 1(162), 150–155.
- Berestova, A. V., Zinyukhin, G. B., & Mezhyueva, L. V. (2014). Features of the technology of functional food fat emulsions. *Vestnik of the Orenburg State University*, 1(162), 150–155. (In Russ.)
- Кулев, Д. Х. (2014). Техническое регулирование пищевых ингредиентов на едином экономическом пространстве. *Контроль качества продукции*, 9, 27–34.
- Kulev, D. H. (2014). Technical regulation of food ingredients in the single economic space. *Product Quality Control*, 9, 27–34. (In Russ.)
- Махова, А. А., Минаев, М. Ю., Куликовский, А. В., & Вострикова, Н. Л. (2019). Изучение ферментативной активности рекомбинантной металлопептидазы, предназначенной для применения в мясной промышленности. *Вопросы питания*, 88(4), 95–104. <https://doi.org/10.24411/0042-8833-2019-10047>
- Makhova, A. A., Minaev, M. Yu., Kulikovskiy, A. V., & Vostrikova, N. L. (2019). Study of the enzymatic activity of a recombinant metallopeptidase intended for use in the meat industry. *Problems of Nutrition*, 88(4), 95–104. (In Russ.) <https://doi.org/10.24411/0042-8833-2019-10047>
- Пушкарев, В. А., Мусина, О. Н., Бельная, С. В., Щербakov, Д. Н., Коваль, А. Д., Белов, А. Н., & Ельчанинов, В. В. (2023). Термостабильность и параметры кинетики Михаэлиса-Ментен инженерного варианта рекомбинантного химозина северного оленя (*Rangifer tarandus*). *Сыроделье и маслоделие*, 3, 42–44.
- Pushkarev, V. A., Musina, O. N., Belenkaya, S. V., Shcherbakov, D. N., Koval, A. D., Belov, A. N., & Elchaninov, V. V. (2023). Thermostability and Michaelis-Menten kinetics parameters of the engineered recombinant chymosin variant from reindeer (*Rangifer tarandus*). *Cheesemaking and Buttermaking*, 3, 42–44. (In Russ.) <https://doi.org/10.31515/2073-4018-2023-3-42-44>
- Хасанова, Д. А., & Тешаев, Ш. Ж. (2020). Воздействие генно-модифицированных продуктов на человеческий организм. *Биология и интегративная медицина*, 5(45), 5–19.
- Khasanova, D. A., & Teshayev, Sh. Zh. (2020). The impact of genetically modified products on the human body. *Biology and Integrative Medicine*, 5(45), 5–19
- Abril, B., Bou, R., García-Pérez, J. V., & Benedito, J. (2023). Role of enzymatic reactions in meat processing and use of emerging technologies for process intensification. *Foods*, 12(10). <https://doi.org/10.3390/foods12101940>
- Aider, M. (2021). Potential applications of ficin in the production of traditional cheeses and protein hydrolysates. *JDS Communications*, 2(5), 233–237. <https://doi.org/10.3168/jdsc.2020-0073>

- Amorim, M. L., Soares, J., Coimbra, J. S. D. R., Leite, M. de O., Albino, L. F. T., & Martins, M. A. (2021). Microalgae proteins: production, separation, isolation, quantification, and application in food and feed. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(12), 1976–2002. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1768046>
- Anishchenko, I., Pellock, S. J., Chidyausiku, T. M., Ramelot, T. A., Ovchinnikov, S., Hao, J., Bafna, K., Norn, C., Kang, A., Bera, A. K., DiMaio, F., Carter, L., Chow, C. M., Montelione, G. T., & Baker, D. (2021). *De novo protein design by deep network hallucination*. *Nature*, 600(7889), 547–552. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04184-w>
- Antuma, L. J., Braitmaier, S. H., Garamus, V. M., Hinrichs, J., Boom, R. M., & Keppler, J. K. (2024). Engineering artificial casein micelles for future food: Preparation rate and coagulation properties. *Journal of Food Engineering*, 366, 111868. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2023.111868>
- Ardö, Y. (2021). Enzymes in Cheese Ripening. In A. L. Kelly & L. B. Larsen (Eds.), *Agents of change: Enzymes in milk and dairy products* (pp. 363–395). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-55482-8_15
- Arshad, Z. I. M., Amid, A., Yusof, F., Jaswir, I., Ahmad, K., & Loke, S. P. (2014). Bromelain: an overview of industrial application and purification strategies. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(17), 7283–7297. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5889-y>
- Ashok, P. P., Dasgupta, D., Ray, A., & Suman, S. K. (2023). Challenges and prospects of microbial α -amylases for industrial application: a review. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 40(2), 44. <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03821-y>
- Augustin, M. A., Hartley, C. J., Maloney, G., & Tyndall, S. (2023). Innovation in precision fermentation for food ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–21. <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2166014>
- Baeshen, M. N., Al-Hejin, A. M., Bora, R. S., Ahmed, M. M. M., Ramadan, H. A. I., Saini, K. S., Baeshen, N. A., & Redwan, E. M. (2015). Production of Biopharmaceuticals in *E. coli*: Current Scenario and Future Perspectives. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(7), 953–962. <https://doi.org/10.4014/jmb.1412.12079>
- Ballinger, R. A. (1978). *A history of sugar marketing through 1974. Agricultural Economic Report No. 382*. USDA. <https://doi.org/10.22004/ag.econ.307665>
- Bankefa, O. E., Samuel-Osamoka, F. C., & Oladeji, S. J. (2022). Improved enzyme production on corncob hydrolysate by a xylose-evolved *Pichia pastoris* cell factory. *Journal of Food Science and Technology*, 59(4), 1280–1287. <https://doi.org/10.1007/s13197-021-05135-z>
- Bayless, T. M., Brown, E., & Paige, D. M. (2017). Lactase Non-persistence and Lactose Intolerance. *Current Gastroenterology Reports*, 19(5), 23. <https://doi.org/10.1007/s11894-017-0558-9>
- Behm, K., Nappa, M., Aro, N., Welman, A., Ledgard, S., Suomalainen, M., & Hill, J. (2022). Comparison of carbon footprint and water scarcity footprint of milk protein produced by cellular agriculture and the dairy industry. *The International Journal of Life Cycle Assessment*, 27(8), 1017–1034. <https://doi.org/10.1007/s11367-022-02087-0>
- Bessler, C., Schmitt, J., Maurer, K.-H., & Schmid, R. D. (2003). Directed evolution of a bacterial α -amylase: toward enhanced pH-performance and higher specific activity. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 12(10), 2141–2149. <https://doi.org/10.1110/ps.0384403>
- Bhatt, V., Clark, L., Geistlinger, T., & Linn, J. (2023). *Hypoallergenic recombinant milk proteins and compositions comprising the same* (Perfect Day, Inc. Patent). <https://patentimages.storage.googleapis.com/ef/bd/15/c34624546b16d5/US20230106635A1.pdf>
- Bhosale, S. H., Rao, M. B., & Deshpande, V. V. (1996). Molecular and industrial aspects of glucose isomerase. *Microbiological Reviews*, 60(2), 280–300. <https://doi.org/10.1128/mr.60.2.280-300.1996>
- Bilal, M., Ji, L., Xu, S., Zhang, Y., Iqbal, H. M. N., & Cheng, H. (2022). Bioprospecting and biotechnological insights into sweet-tasting proteins by microbial hosts-a review. *Bioengineered*, 13(4), 9815–9828. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2061147>
- Bodie, E. A., Armstrong, G. L., & Dunn-Coleman, N. S. (1994). Strain improvement of chymosin-producing strains of *Aspergillus niger* var. *awamori* using parasexual recombination. *Enzyme and Microbial Technology*, 16(5), 376–382. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)90151-1](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)90151-1)
- Borrelli, G., & Trono, D. (2015). Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(9), 20774–20840. <https://doi.org/10.3390/ijms160920774>
- Boukid, F., Ganeshan, S., Wang, Y., Tülbek, M. Ç., & Nickerson, M. T. (2023). Bioengineered enzymes and precision fermentation in the food industry. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(12). <https://doi.org/10.3390/ijms241210156>
- Bray, G. A., Nielsen, S. J., & Popkin, B. M. (2004). Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(4), 537–543. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.4.537>
- Cairns, T. C., Nai, C., & Meyer, V. (2018). How a fungus shapes biotechnology: 100 years of *Aspergillus niger* research. *Fungal Biology and Biotechnology*, 5, 13. <https://doi.org/10.1186/s40694-018-0054-5>

- Casado, V., Martín, D., Torres, C., & Reglero, G. (2012). Phospholipases in food industry: A review. In *Lipases and Phospholipases* (pp. 495–523). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-600-5_29
- Casey, J. P. (1976). High fructose corn syrup. A case history of Innovation. *Starch*, 29, 196–204. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/star.19770290605>
- Cramer, J. F., Kolkman, M. A. B., Ma, Z., Scheffers, M., Shipovskov, S., Van Brussel-Z, M., & Yu, S. (2018). *Methods of using thermostable serine proteases* (Dupont Nutrition Biosciences APC Patent). <https://patentimages.storage.googleapis.com/9a/9c/63/f6766beb736a76/WO2018118815A1.pdf>.
- Crippa, M., Solazzo, E., Guizzardi, D., Monforti-Ferrario, F., Tubiello, F. N., & Leip, A. (2021). Food systems are responsible for a third of global anthropogenic GHG emissions. *Nature Food*, 2(3), 198–209. <https://doi.org/10.1038/s43016-021-00225-9>
- Crowell, L. E., Goodwine, C., Holt, C. S., Rocha, L., Vega, C., Rodriguez, S. A., Dalvie, N. C., Tracey, M. K., Puntel, M., Wigdorovitz, A., Parreño, V., Love, K. R., Cramer, S. M., & Love, J. C. (2021). Development of a platform process for the production and purification of single-domain antibodies. *Biotechnology and Bioengineering*, 118(9), 3348–3358. <https://doi.org/10.1002/bit.27724>
- Dahiya, S., Bajaj, B. K., Kumar, A., Tiwari, S. K., & Singh, B. (2020). A review on biotechnological potential of multifarious enzymes in bread making. *Process Biochemistry*, 99, 290–306. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.09.002>
- Deckers, M., Deforce, D., Fraiture, M.-A., & Roosens, N. H. C. (2020). Genetically Modified Micro-Organisms for Industrial Food Enzyme Production: An Overview. *Foods* (Basel, Switzerland), 9(3). <https://doi.org/10.3390/foods9030326>
- De Maria, L., Vind, J., Oxenbøll, K. M., Svendsen, A., & Patkar, S. (2007). Phospholipases and their industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(2), 290–300. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0775-x>
- Farag, M. A., Rezk, M. M., Hamdi Elashal, M., El-Araby, M., Khalifa, S. A. M., & El-Seedi, H. R. (2022). An updated multifaceted overview of sweet proteins and dipeptides as sugar substitutes; the chemistry, health benefits, gut interactions, and safety. *Food Research International*, 162(Pt A), 111853. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111853>
- Farooq, M. A., Ali, S., Hassan, A., Tahir, H. M., Mumtaz, S., & Mumtaz, S. (2021). Biosynthesis and industrial applications of α -amylase: a review. *Archives of Microbiology*, 203(4), 1281–1292. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02128-y>
- Fasim, A., More, V. S., & More, S. S. (2021). Large-scale production of enzymes for biotechnology uses. *Current Opinion in Biotechnology*, 69, 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.12.002>
- Fernandes, P. (2010). Enzymes in food processing: a condensed overview on strategies for better biocatalysts. *Enzyme Research*, 2010, 862537. <https://doi.org/10.4061/2010/862537>
- Fernández-Lucas, J., Castañeda, D., & Hormigo, D. (2017). New trends for a classical enzyme: Papain, a biotechnological success story in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 68, 91–101. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.017>
- Filkin, S. Y., Lipkin, A. V., & Fedorov, A. N. (2020). Phospholipase Superfamily: Structure, Functions, and Biotechnological Applications. *Biochemistry. Biokhimiia*, 85(Suppl 1), S177–S195. <https://doi.org/10.1134/S0006297920140096>
- Fraatz, M. A., Rühl, M., & Zorn, H. (2014). Food and feed enzymes. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 143, 229–256. https://doi.org/10.1007/10_2013_235
- Fuller, R.B. (1973). *Nine chains to the moon* (pp. 252–259). Philadelphia: Anchor Books.
- Geistlinger T., Jensen H., Jhala R., Meerman, H., Ramesh, B., Wagoner, T., Johnson T. S., Wu V.W.-X., & Manea. F. (2020). *Recombinant components and compositions for use in food products* (Perfect Day Inc. Patent). (<https://patents.google.com/patent/WO2018039632A1>)
- Geistlinger T., Jhala R., Krueger K.P., & Ramesh, B. (2018). Food products comprising milk proteins and non-animal proteins, and methods of producing the same (Perfect Day Inc. Patent). <https://patents.google.com/patent/CA3034678A1>
- Glinsmann, W. H., Irausquin, H., & Park, Y. K. (1986). Evaluation of health aspects of sugars contained in carbohydrate sweeteners. Report of sugars task force, 1986. *The Journal of Nutrition*, 116(11 Suppl), S1–S216. https://doi.org/10.1093/jn/116.suppl_11.S1
- Healey, R. D., Lebharr, H., Hornung, S., Thordarson, P., & Marquis, C. P. (2017). An improved process for the production of highly purified recombinant thaumatin tagged-variants. *Food Chemistry*, 237, 825–832. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.018>
- Herrera-Estala, A. L., Fuentes-Garibay, J. A., Guerrero-Olazarán, M., & Viader-Salvadó, J. M. (2022). Low specific growth rate and temperature in fed-batch cultures of a beta-propeller phytase producing *Pichia pastoris* strain under GAP promoter trigger increased KAR2 and PSA1–1 gene expression yielding enhanced extracellular productivity. *Journal of Biotechnology*, 352, 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2022.05.010>
- Hettinga, K., & Bijl, E. (2022). Can recombinant milk proteins replace those produced by animals? *Current Opinion in Biotechnology*, 75, 102690. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102690>
- Hoppenreijts, L. J. G., Annibal, A., Vreeke, G. J. C., Boom, R. M., & Keppler, J. K. (2024). Food proteins from yeast-based precision fermentation: Simple purification of recombinant

- β -lactoglobulin using polyphosphate. *Food Research International*, 176, 113801. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113801>
- Jaeckel C., Lund M., Hansen E.F., Riisberg L., Jeppesen I., & Van Den Brink J.M. (2016). *Variants of chymosin with improved properties* (Chr. Hansen A/S Patent). <https://patentimages.storage.googleapis.com/c2/ac/60/64bade251bd323/AU2017267273B2>
- Jaeckel C., Lund M., Hansen E. F., Riisberg L., Jeppesen I., & Van den Brink J.M. (2019). *Variants of chymosin with improved properties* (Chr. Hansen A/S Patent). <https://patentimages.storage.googleapis.com/c2/ac/60/64bade251bd323/AU2017267273B2>
- Järviö, N., Parviainen, T., Maljanen, N.-L., Kobayashi, Y., Kujanpää, L., Ercili-Cura, D., Landowski, C. P., Rynänen, T., Nordlund, E., & Tuomisto, H. L. (2021). Ovalbumin production using *Trichoderma reesei* culture and low-carbon energy could mitigate the environmental impacts of chicken-egg-derived ovalbumin. *Nature Food*, 2(12), 1005–1013. <https://doi.org/10.1038/s43016-021-00418-2>
- Jia, B., & Jeon, C. O. (2016). High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives. *Open Biology*, 6(8). <https://doi.org/10.1098/rsob.160196>
- Jin, L., Wan, Q., Ouyang, S., Zheng, L., Cai, X., Zhang, X., Shen, J., Jia, D., Liu, Z., & Zheng, Y. (2023). Isomerase and epimerase: overview and practical application in production of functional sugars. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–16. <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2260888>
- Joseph, J. A., Akkermans, S., Nimmegeers, P., & Van Impe, J. F. M. (2019). Bioproduction of the recombinant sweet protein thaumatin: Current State of the art and perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 10, 695. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00695>
- Kappeler, S. R., van den Brink, H. J. M., Rahbek-Nielsen, H., Farah, Z., Puhani, Z., Hansen, E. B., & Johansen, E. (2006). Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 342(2), 647–654. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.02.014>
- Karray, A., Gargouri, Y., Verger, R., & Bezzine, S. (2012). Phospholipase A2 Purification and Characterization: A Case study. In G. Sandoval (Ed.), *Lipases and Phospholipases: Methods and protocols* (pp. 283–297). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-600-5_17
- Kelada, K. D., Tusé, D., Gleba, Y., McDonald, K. A., & Nandi, S. (2021). Process Simulation and Techno-Economic Analysis of Large-Scale Bioproduction of Sweet Protein Thaumatin II. *Foods*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/foods10040838>
- Khamies, M., Hagar, M., Kassem, T. S. E., & Moustafa, A. H. E. (2024). Case study of chemical and enzymatic degumming processes in soybean oil production at an industrial plant. *Scientific Reports*, 14(1), 4064. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-53865-9>
- Khootama, A., Putri, D. N., & Hermansyah, H. (2018). Techno-economic analysis of lipase enzyme production from *Aspergillus niger* using agro-industrial waste by solid state fermentation. In *5th International Conference on Energy and Environment Research*, ICEER (pp. 143–148). IEEE. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2018.10.054>
- Kumar, A., Grover, S., Sharma, J., & Batish, V. K. (2010). Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(4), 243–258. <https://doi.org/10.3109/07388551.2010.483459>
- Lee, J.-W., Cha, J.-E., Jo, H.-J., & Kong, K.-H. (2013). Multiple mutations of the critical amino acid residues for the sweetness of the sweet-tasting protein, brazzein. *Food Chemistry*, 138(2–3), 1370–1373. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.140>
- Lerner, A., & Benzvi, C. (2021). Microbial Transglutaminase Is a Very Frequently Used Food Additive and Is a Potential Inducer of Autoimmune/Neurodegenerative Diseases. *Toxics*, 9(10). <https://doi.org/10.3390/toxics9100233>
- Lilbaek, H. M., Broe, M. L., Høier, E., Fatum, T. M., Ipsen, R., & Sørensen, N. K. (2006). Improving the yield of Mozzarella cheese by phospholipase treatment of milk. *Journal of Dairy Science*, 89(11), 4114–4125. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72457-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72457-2)
- Linder, T. (2019). Making the case for edible microorganisms as an integral part of a more sustainable and resilient food production system. *Food Security*, 11(2), 265–278. <https://doi.org/10.1007/s12571-019-00912-3>
- Liu, Q., Xun, G., & Feng, Y. (2019). The state-of-the-art strategies of protein engineering for enzyme stabilization. *Biotechnology Advances*, 37(4), 530–537. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.10.011>
- Liu, X., Lian, M., Zhao, M., & Huang, M. (2024). Advances in recombinant protease production: current state and perspectives. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 40(5), 144. <https://doi.org/10.1007/s11274-024-03957-5>
- Li, W., Huang, C., & Chen, J. (2022). The application of CRISPR/Cas mediated gene editing in synthetic biology: Challenges and optimizations. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 890155. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.890155>
- Li, Y., Zhang, H., Fu, Y., Zhou, Z., Yu, W., Zhou, J., Li, J., Du, G., & Liu, S. (2024). Enhancing Acid Resistance of *Aspergillus niger* Pectin Lyase through Surface Charge Design for Improved Application in Juice Clarification. *Journal of*

- Agricultural and Food Chemistry*, 72(20), 11652–11662. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.4c01505>
- Martins, I. M., Matos, M., Costa, R., Silva, F., Pascoal, A., Estevinho, L. M., & Choupina, A. B. (2014). Transglutaminases: recent achievements and new sources. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(16), 6957–6964. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5894-1>
- Mayolo-Deloisa, K., González-González, M., & Rito-Palomares, M. (2020). Laccases in food industry: Bioprocessing, potential industrial and biotechnological applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 222. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00222>
- Meyer, V. (2008). Genetic engineering of filamentous fungi – Progress, obstacles and future trends. *Biotechnology Advances*, 26(2), 177–185. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.12.001>
- Meyer, V. (2021). Metabolic Engineering of Filamentous Fungi. In *Metabolic Engineering* (pp. 765–801). <https://doi.org/10.1002/9783527823468.ch20>
- Meyer, V., Fiedler, M., Nitsche, B., & King, R. (2015). The Cell Factory *Aspergillus* Enters the Big Data Era: Opportunities and Challenges for Optimising Product Formation. In R. Krull & T. Bley (Eds.), *Filaments in bioprocesses* (pp. 91–132). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/10_2014_297
- Motta, J., Freitas, B. C., Almeida, A., Martins, G., & Borges, S. (2023). Use of enzymes in the food industry: A review. *Food Science and Technology*, 43. <https://doi.org/10.1590/fst.106222>
- Peña, D. A., Gasser, B., Zanghellini, J., Steiger, M. G., & Mattanovich, D. (2018). Metabolic engineering of *Pichia pastoris*. *Metabolic Engineering*, 50, 2–15. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.04.017>
- Petcharat, T., & Benjakul, S. (2018). Effect of gellan incorporation on gel properties of bigeye snapper surimi. *Food Hydrocolloids*, 77, 746–753. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.11.016>
- Püllmann, P., & Weissenborn, M. J. (2021). Improving the Heterologous Production of Fungal Peroxygenases through an Episomal *Pichia pastoris* Promoter and Signal Peptide Shuffling System. *ACS Synthetic Biology*, 10(6), 1360–1372. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.0c00641>
- Rathnakumar, K., Ortega-Anaya, J., Jimenez-Flores, R., & Martínez-Monteagudo, S. I. (2023). Partition of milk phospholipids during ice cream manufacturing. *Journal of Dairy Science*, 106(11), 7501–7514. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-23145>
- Raveendran, S., Parameswaran, B., Ummalya, S. B., Abraham, A., Mathew, A. K., Madhavan, A., Rebello, S., & Pandey, A. (2018). Applications of microbial enzymes in food industry. *Food Technology and Biotechnology*, 56(1), 16–30. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.01.18.5491>
- Robinson, P. K. (2015). Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in Biochemistry*, 59, 1–41. <https://doi.org/10.1042/bse0590001>
- Roy-Chaudhuri, B., & Shankar, M. (2020). Strains and methods for production of heme-containing proteins (WO2020219972A1).
- Saad, M. M., Saad, A. M., Hassan, H. M., Ibrahim, E. I., Abdelraouf, M., & Ali, B. A. (2023). Optimization of tannase production by *Aspergillus glaucus* in solid-state fermentation of black tea waste. *Bioresources and Bioprocessing*, 10(1), 73. <https://doi.org/10.1186/s40643-023-00686-9>
- Salazar-Cerezo, S., de Vries, R. P., & Garrigues, S. (2023). Strategies for the development of industrial fungal producing strains. *Journal of Fungi*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/jof9080834>
- Siddiqui, S. A., Erol, Z., Rugji, J., Taşçı, F., Kahraman, H. A., Toppi, V., Musa, L., Di Giacinto, G., Bahmid, N. A., Mehdizadeh, M., & Castro-Muñoz, R. (2023). An overview of fermentation in the food industry — Looking back from a new perspective. *Bioresources and Bioprocessing*, 10(1), 85. <https://doi.org/10.1186/s40643-023-00702-y>
- Singh, R., Kim, S., Kumari, A., & Mehta, P. (2022). An Overview of Microbial α -amylase and Recent Biotechnological Developments. *Current Biotechnology*, 11. <https://doi.org/10.2174/2211550111666220328141044>
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., & Mehta, P. K. (2016). Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. 3 *Biotech*, 6(2), 174. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0485-8>
- Solanki, P., Putatunda, C., Kumar, A., Bhatia, R., & Walia, A. (2021). Microbial proteases: ubiquitous enzymes with innumerable uses. 3 *Biotech*, 11(10), 428. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02928-z>
- Spohner, S. C., Müller, H., Quitmann, H., & Czermak, P. (2015). Expression of enzymes for the usage in food and feed industry with *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 202, 118–134. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.01.027>
- Sun, H., Bankefa, O. E., Ijeoma, I. O., Miao, L., Zhu, T., & Li, Y. (2017). Systematic assessment of *Pichia pastoris* system for optimized β -galactosidase production. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2(2), 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2017.04.001>
- Tekaia, F., & Yeramian, E. (2006). Evolution of proteomes: fundamental signatures and global trends in amino acid compositions. *BMC Genomics*, 7(1), 307. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-307>

- Teng, T. S., Chin, Y. L., Chai, K. F., & Chen, W. N. (2021). Fermentation for future food systems: Precision fermentation can complement the scope and applications of traditional fermentation. *EMBO Reports*, 22(5), e52680. <https://doi.org/10.15252/embr.202152680>
- Vojnovic, S., Aleksic, I., Ilic-Tomic, T., Stevanovic, M., & Nikodinovic-Runic, J. (2024). *Bacillus* and *Streptomyces* spp. as hosts for production of industrially relevant enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 108(1), 185. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12900-x>
- White, J. S. (2008). Straight talk about high-fructose corn syrup: what it is and what it ain't. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88(6), 1716S-1721S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2008.25825B>
- Wolff A., Gaydar V., & Cohavi O. (2022). Methods of producing animal-free casein compositions, casein compositions and use of same (Baio Patent). <https://data.epo.org/publication-server/rest/v1.0/publication-dates/20221207/patents/EP4098128NWA1>
- Yang, H., Song, C., Liu, C., & Wang, P. (2024). Synthetic Biology Tools for Engineering *Aspergillus oryzae*. *Journal of Fungi*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/jof10010034>
- Yuan, F., Li, G., Li, Z., Li, M., Liu, X., Yang, H., & Yu, X. (2024). Efficient biosynthesis of transglutaminase in *Streptomyces mobaraensis* via systematic engineering strategies. *Current Research in Food Science*, 8, 100756. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2024.100756>
- Yu, F., Zhao, X., Zhou, J., Lu, W., Li, J., Chen, J., & Du, G. (2023). Biosynthesis of High-Active Hemoproteins by the Efficient Heme-Supply *Pichia Pastoris* Chassis. *Advanced Science*, 10(30), e2302826. <https://doi.org/10.1002/advs.202302826>
- Zhang, L., Zhao, C., Zhu, D., Ohta, Y., & Wang, Y. (2004). Purification and characterization of inulinase from *Aspergillus niger* AF10 expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 35(2), 272–275. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2004.02.015>
- Zhang, X., Chen, S., Lin, Y., Li, W., Wang, D., Ruan, S., Yang, Y., & Liang, S. (2023). Metabolic Engineering of *Pichia pastoris* for High-Level Production of Lycopene. *ACS Synthetic Biology*, 12(10), 2961–2972. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.3c00294>
- Zhu, M., Zhai, W., Song, R., Lin, L., Wei, W., & Wei, D. (2023). Enhanced thermostability of *Geobacillus stearothermophilus* α -Amylase by rational design of disulfide bond and application in corn starch liquefaction and bread quality improvement. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(48), 18928–18942. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c06761>