

## CirCasein

Enabling Circular Economy through Novel Caseins

|                                 |                                                                                                                                                                 |                        |               |
|---------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|---------------|
| <b>Programm / Ausschreibung</b> | Humanpotenzial, Humanpotenzial, Industrienahe Dissertationen 2023                                                                                               | <b>Status</b>          | abgeschlossen |
| <b>Projektstart</b>             | 01.12.2023                                                                                                                                                      | <b>Projektende</b>     | 30.11.2026    |
| <b>Zeitraum</b>                 | 2023 - 2026                                                                                                                                                     | <b>Projektlaufzeit</b> | 36 Monate     |
| <b>Keywords</b>                 | circular economy, sustainability, climate neutrality, novel protein, recombinant casein, precision fermentation, cheese, food, functionality, dairy alternative |                        |               |

### Projektbeschreibung

Die Milchwirtschaft trägt erheblich zu den weltweiten Treibhausgasemissionen bei. Dennoch besteht eine große Nachfrage nach Milchprodukten. Käse ist weltweit das am zweithäufigsten konsumierte Milcherzeugnis und wird wegen seines Geschmacks und seiner Textur, z.B., der Dehnbarkeit, geschätzt. Die gewünschten Käseeigenschaften sind größtenteils auf Milchproteine - Kaseine - zurückzuführen. Kaseine dienen als Grundstruktur für verschiedene Käsesorten. In Kuhmilch machen Kaseine 80 % aller Milchproteine aus. Die derzeitige Herstellung von Kaseinen hat jedoch erhebliche ökologische Auswirkungen. Daher ist es wichtig, neue Technologien einzuführen, die funktionelle Proteine liefern und gleichzeitig die Kreislauffähigkeit verbessern. Unser Unternehmen setzt die Präzisionsfermentation ein, um innovative Kaseine mit identischen Aminosäuresequenzen wie Rinderkaseine zu entwickeln.

Im Rahmen dieses Projekts werden die lebensmittelrelevante Funktionalität dieser neuartigen Kaseine von der Mikro- bis zur Makroebene aufgedeckt. Wir wollen sie mit ihren nativen, vom Rind stammenden Gegenstücken vergleichen, von denen bekannt ist, dass sie einer linearen Wirtschaft folgen. Das Projekt befasst sich mit drei Forschungsfragen: (1) Wie verhalten sich die physikochemischen Eigenschaften rekombinanter Kaseine im Vergleich zu Rinderkaseinen? (2) Welcher Zusammenhang besteht zwischen dem Phasenverhalten (Sol-Gel-Übergang) einer einzelnen rekombinanten Kaseinfraktion und deren Mischungen und ihren rheologischen und mikrostrukturellen Eigenschaften? und (3) Wie sind die rheologischen, mechanischen und mikrostrukturellen Eigenschaften von säureinduzierten Emulsionsproteingelen aus rekombinanten Kaseinen? Zusammen decken diese drei Fragen lebensmittelrelevante Längenskalen von  $\mu\text{m}$  zur Makroebene ab. Die angewandten Methoden umfassen Verfahren zur Charakterisierung von Proteinen und lebensmittelrelevante Funktionalitäten (z. B. Gelierung). Die Techniken umfassen den Einsatz eines Nanosizers, DSC und Röntgenstreuung. Ein Rheometer wird zur Bestimmung der rheologischen Eigenschaften von Gelen eingesetzt. Darüber hinaus wird die Mikrostruktur der entstandenen Gele visualisiert, z. B. mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie (CSLM).

Das vorgeschlagene Thema fällt unter "Rethink and Reduce" (Umdenken und Reduzieren) in Übereinstimmung mit den Zielen der vorliegenden Aufforderung. Ziel ist die Optimierung der Nutzung von Ressourcen, in diesem Fall von rekombinanten Kaseinen, für ihre Anwendung in der Käseherstellung. Es gibt kein Vorwissen, das dem Umfang des

vorgeschlagenen Projekts nahe kommt. Der Präzisionsfermentation wird ein großes Potenzial für die Förderung einer effizienten und nachhaltigen vertikalen Produktion von Zutaten in städtischen Gebieten wie Wien zugeschrieben. Damit unterstützt sie das Ziel der österreichischen Wirtschaft und Gesellschaft, bis 2050 eine klimaneutrale und nachhaltige Kreislaufwirtschaft zu erreichen.

## **Abstract**

Dairy farming contributes significantly to global greenhouse gas emissions. Yet, there is high demand for dairy products. Cheese is the second most consumed dairy product globally, with Europe being the most popular region. Cheese is enjoyed by many people for its taste and texture, including stretchiness. The desired properties of cheese are largely due to milk proteins - caseins. Caseins serve as the fundamental structure for various types of cheese. In cow's milk, caseins constitute 80% of all milk proteins. However, the current manufacturing of caseins has significant ecological impacts. Therefore, it is important to introduce novel technologies that offer highly effective proteins while enhancing circularity. Our organization employs precision fermentation to develop innovative caseins with identical amino acid sequences to bovine caseins.

In this proposed project, we will unveil the food-relevant functionality of these novel caseins, covering length scales from micro to macro-scale. We aim to compare them with their native counterparts, bovine-derived, that are known to follow the linear economy. There are three research questions addressed in the project: (1) How do the physicochemical properties of recombinant caseins compare to bovine caseins?; (2) What is the relationship between the phase behavior in terms of sol-gel transition of a single recombinant casein fraction and mixtures thereof and their rheological and microstructural properties?; and (3) How are the rheological, mechanical, and microstructural properties of acid-induced emulsion protein gels produced from recombinant caseins? Together, these three will cover different length scales relevant to food systems, from molecular to macroscopic scale. The methods used will include protein characterization methods and food-relevant functionalities (e.g., gelation). Techniques involving the use of a nanosizer, DSC, and X-ray scattering. A rheometer will be used to determine rheological properties of gels. Furthermore, the microstructure of the resulting gels will be visualized, e.g., by a confocal microscopy (CSLM).

The proposed topic will fall under Rethink and Reduce in accordance with the goals of the present call. The goal is to optimize the use of resources, in this case, recombinant caseins for their application in cheese manufacturing. There is no prior knowledge available close to the scope of this proposed project. Precision fermentation is acknowledged to have great potential for fostering efficient and sustainable vertical production of ingredients in urban settings such as Vienna. Thus, it supports the ambition of the Austrian economy and society to a climate-neutral and sustainable circular economy by 2050.

## **Endberichtkurzfassung**

Frustration with the current unsustainable dairy practices serves as the driving force for the CirCasein project. Dairy farming is considerably the highest greenhouse gas (GHG) emissions contributor in European livestock farming. Conversely, consumers, including us, demand high availability of dairy-based products for both nutrition and indulgence reasons, such as cheese. Cheeses are the second most consumed dairy product around the world with the most popular region being Europe.

Cheeses are enjoyed by many because of their taste and textural experiences, such as their crumbliness, melting ability, and stretchiness. To get these desired properties, we cannot avoid the significant roles of milk proteins called caseins. Caseins serve as the key structural backbone for all different cheeses. However, the current production of bovine caseins

results in huge ecological footprints. Therefore, these past years many efforts have focused on replacing them with plant proteins. However, this replacement is not easy; plant proteins cannot fulfill many functionalities possessed by caseins. Thus, in recent years, precision fermentation has appeared as a promising sustainable new solution that can provide novel ingredients with superior techno-functional properties. This technology is also offered by Fermify, a Vienna-based B2B start-up. Using Fermify's technology, the bioidentical bovine beta-casein can be produced.

CirCasein project aimed to unveil the techno-functional properties of novel beta-casein produced via Fermify's state-of-the-art precision fermentation, and compared it to the native bovine beta-casein. We investigated the basic characteristics, such as solubility, calcium sensitivity, surface charge, structure, and thermal stability as well as the food-relevant functionality such as gelation ability. The results showed that the novel beta-casein (simply called recombinant beta-casein) has huge potential as the alternative to the native bovine beta-casein. The novel casein followed a similar pattern of behavior as the native one. This opens a new door for new food-relevant applications.

For the last note, in this project, we specifically focused on the comparison between the native bovine and the recombinant beta-casein in terms of their techno-functional properties. We showed that there were many potentials for recombinant beta-casein regarding these properties. However, to have a comprehensive understanding, further research still needs to be done, especially related to its nutritional value, economic feasibility, or more in-depth ecological study.

## **Projektpartner**

- Fermify GmbH