

# Kultivirano meso: Pregled novih tehnologija i izazova kod predkomercijalne proizvodnje

---

Rudnički, Tin

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:268910>

*Rights / Prava:* [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-14**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Tin Rudnički**  
58216438

**KULTIVIRANO MESO: PREGLED NOVIH  
TEHNOLOGIJA I IZAZOVA KOD  
PREDKOMERCIJALNE PROIZVODNJE**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Kemija i tehnologija mesa i ribe

**Mentor:** prof. dr. sc. Helga Medić

**Zagreb, 2022.**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo  
Laboratorij za tehnologiju mesa i ribe

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

**Kultivirano meso: Pregled novih tehnologija i izazova kod predkomercijalne proizvodnje**

**Tin Rudnički, 58216438**

## **Sažetak:**

Stanična agrikultura je relativno novo i dinamično znanstveno područje. Kultivirano meso stvoreno *in-vitro* uzgojem životinjskih stanica je u suštini stvarno meso koje ima golem potencijal zamijeniti konvencionalne metode proizvodnje mesa u svrhu rješavanja imperativnih problema na razini čovječanstva koji se tiču okoliša i dobrobiti životinja. Kao novo područje, neprestano se razvija i nove tehnologije kontinuirano izlaze. Stoga, cilj ovog rada je pregled novih tehnologija, znanstvenih istraživanja i potencijalnih rješenja za savladavanje tehnoloških prepreka ka putu do ekonomski isplative komercijalizacije. Do cilja proizvodnje mesa okusom jednakim ili boljim te cijene iste ili niže naspram konvencionalnog mesa prepreke su brojne i postoje u svakom segmentu kultiviranog mesa: stanične linije, medij za stanice, nosači i bioreaktori. Potrebna su dodatna brojna istraživanja i inovacije, a u svrhu ostvarenja cilja bit će potreban dotok visokokvalificiranih stručnjaka te značajno više investicija, kako iz privatnog sektora, tako i iz javnog.

**Ključne riječi:** meso, kultivirano, stanice, nosači, medij

**Rad sadrži:** 35 stranica, 7 slika, 2 tablice, 50 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

**Mentor:** prof. dr. sc. Helga Medić

**Datum obrane:** 13. rujna 2022.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
University undergraduate study Food Technology

Department of Food Engineering  
Laboratory for Meat and Fish Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Food Technology

**Cultivated Meat: A Review of New Technologies and Challenges in Pre-Commercial Production**

**Tin Rudnički, 58216438**

**Abstract:**

Cellular agriculture is an emerging and dynamic research field. Cultivated meat produced by *in-vitro* cell culturing is genuine meat that has an enormous potential in replacing conventional methods of meat production in order to alleviate some of the most pressing issues humanity is dealing with today. As a nascent field, it's continually evolving and novel technologies are regularly being released. Therefore, the goal of this work was to review the latest technologies, scientific research, and potential solutions for overcoming the technological hurdles on the way to commercialization. On the path to producing meat that tastes the same or better and costs the same or less numerous roadblocks remain which are present in every segment of production: cell lines, culture media, scaffolds, and bioreactors. Overall, additional research, innovation, and an inflow of experienced researchers and innovators are needed. Also, substantial funding will be crucial.

**Keywords:** meat, cultivated, cells, scaffolds, medium

**Thesis contains:** 35 pages, 7 figures, 2 tables, 50 references

**Original in:** Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

**Mentor:** Helga Medić, PhD, Full Professor

**Thesis defended:** 13<sup>th</sup> of September, 2022

## Sadržaj

1.UVOD .....	1
2.TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. MOTIVACIJA ZA PROIZVODNJU ALTERNATIVNIH PROTEINA.....	2
2.2. PROCES PROIZVODNJE KULTIVIRANOG MESA.....	4
2.3. STANIČNE LINIJE .....	6
2.3.1. ODRASLE MATIČNE STANICE .....	6
2.3.2. SATELITNE STANICE .....	7
2.3.3. FIBROBLASTI, MIOFIBROBLASTI, FIBROADIPOGENSKE PROGENITORSKE STANICE (FAP), MEZENHIMALNE MATIČNE STANICE (MSC) .....	9
2.3.4. DIFERENCIJACIJA ODRASLIH MATIČNIH STANICA .....	9
2.3.5. PLURIPOTENTNE STANICE .....	9
2.3.6. EMBRIJSKE MATIČNE STANICE .....	10
2.3.7. INDUCIRANE PLURIPOTENTNE MATIČNE STANICE .....	10
2.3.8. DIFERENCIJACIJA PLURIPOTENTNIH MATIČNIH STANICA .....	10
2.4. MEDIJ ZA UZGOJ STANICA .....	12
2.4.1. BAZALNI MEDIJ .....	12
IZVORI DUŠIKA U MEDIJU .....	12
AMINOKISELINE .....	12
IZVORI UGLJIKA U MEDIJU .....	13
GLUKOZA.....	14
ANORGANSKE SOLI .....	14

VITAMINI .....	14
PUFERI .....	15
2.4.2. SERUM .....	15
FETALNI GOVEDI SERUM (FBS OD ENG. <i>FETAL BOVINE SERUM</i> ) .....	16
2.4.3. ZAMJENA ZA SERUM .....	16
ENDOGENA PROIZVODNJA FAKTORA RASTA .....	17
LIZATI LJUDSKIH TROMBOCITA .....	17
BILJNI ILI FUNGALNI HOMOLOZI FAKTORIMA RASTA .....	17
KONDICIONIRANI MEDIJ .....	17
2.4.4. ANTIBIOTICI .....	17
2.4.5. PODRUČJA KOJA ZAHTIJEVAJU DODATNA ISTRAŽIVANJA .....	18
2.5. NOSAČI .....	19
2.5.1. OD MATIČNIH STANICA DO STRUKTURIRANIH ORGANOIDA <b>ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.</b>	
2.5.2. EKSTRACELULARNI MATRIKS .....	19
2.5.3. BIOMATERIJALI ZA NOSAČE .....	20
2.5.4. TEHNIKE IZRADE NOSAČA .....	22
2.5.5. MIKRONOSAČI.....	22
2.5.5.1. HIDROGELOVI .....	23
2.5.6. POROZNI NOSAČI .....	25
2.5.7. VLAKNASTI NOSAČI.....	26
2.5.8. 3D BIOPRINTANJE .....	27

2.5.9. PRISTUPI BEZ NOSAČA .....	27
2.5.10. DECELULARIZIRANO TKIVO .....	28
3.ZAKLJUČCI.....	30
4.POPIS LITERATURE .....	31

## 1. UVOD

2013. godine, austrijska kritičarka hrane Hanni Rützler imala je priliku prva pod okom javnosti okusiti burger vrijedan 330,000 \$. Dakako, to nije bio konvencionalan burger, već pljeskavica proizvedena *in-vitro* uzgojem stanica govedine. Bilo je to djelo nizozemskog znanstvenika Marka Posta te njegovog tima koji su se, svjesni uloge animalne agrikulture u klimatskim promjenama, neetičkom tretiranju životinja te neodrživosti mesne industrije, odlučili na ovaj projekt. Događaj popraćen velikim brojem medija označen je kao uspješan: osim pozitivnih ocjena kritičara, služio je kao svojevrsni akcelerator područja stanične agrikulture. U prilog tomu idu i investicije u područje, koje su 2016.-2021. iznosile 1,93 milijardi \$, a samo u 2021. 1,38 milijardi \$ (71 % ukupnih investicija), što jasno naznačuje kako je područje u naglom usponu te da je ovo tek začetak ozbiljnih znanstvenih istraživanja, bilo u privatnim tvrtkama ili javnim institucijama (Cohen i sur., 2022).

Stanična agrikultura je znanstveno područje usredotočeno na uzgoj konvencionalnih agrikulturalnih proizvoda iz staničnih kultura. Korištenjem biotehnoloških metoda, moguće je rekapitulirati proizvode kao što su koža, meso (govedina, svinjetina, perad, plodovi mora, ali i neke egzotične životinje), mlijeko i jaja izbjegavajući na taj način štetne učinke tradicionalne životinjske agrikulture, a dobivajući na kraju proizvod identičan, ili superiorniji, onom konvencionalnom.

S obzirom da je *in-vitro* uzgoj mesa nedvojbeno moguć i obećavajući proces, a da na putu ka komercijalizaciji i upregnuću proizvodnih pogona industrijskih razmjera stoji niz zapreka, uključujući završnu cijenu proizvoda i tehnološka pitanja, cilj ovog rada, osim rekapitulacija osnova proizvodnje čistog mesa, je analiza tehnoloških prepreka, najnovijih tehnologija za njihovo svladavanje, aktivnih područja rada i isticanje inovacijskih prioriteta te dati generalni pregled trenutnog stanja industrije.



## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. MOTIVACIJA ZA PROIZVODNJU ALTERNATIVNIH PROTEINA

Odavno je poznato da je trenutni sustav industrijske animalne agrokulture neodrživ. Općenito, današnji sustavi za proizvodnju proteina odgovorni su za pojedinačno najveću antropogensku upotrebu zemljišta te su jedan od vodećih pokretača krčenja šuma (Song i sur., 2018). Točnije, koriste 70% agrokulturalno relevantne zemlje, odnosno 30% kopnene površine Zemlje (Steinfeld, 2006). Specifično, više od 1/4 zemlje bez leda koristi se za ispašu stoke, a 1/3 namijenjena je hranidbi domaćih životinja (Shapiro, 2018). Ako broj uzgojenih životinja za hranu nastavlja rasti, jednostavno neće postojati dovoljno obradive površine za opskrbu svjetskog stanovništva tolikom količinom životinjskih proizvoda. Istina je, nažalost, da se do 2050. očekuje potrošnja mesa za 70% veća u odnosu na 2011. što sa sobom nosi povećanje emisija stakleničkih plinova za 80% od 2014. Doista, sektor animalne agrokulture je odgovoran za 18% emisija svih stakleničkih plinova, što je više nego emisije cijelog prometnog sustava zajedno (Steinfeld, 2006). Ako čovječanstvo želi ikakvu šansu u ispunjavanju zahtjeva Pariškog sporazuma, odnosno ograničavanju globalnog zatopljenja do 1,5 °C u odnosu na predindustrijsku razinu, ključno je istaknuti da je isto nemoguće realizirati bez značajnih promjena u sustavu hrane. Dapače, čak i da se sve emisije iz industrije fosilnih goriva odmah zaustave, emisije iz prehrambene industrije bi onemogućile ispunjavanje navedenog zahtjeva (Clark i sur., 2020). Navedene tvrdnje proizlaze iz činjenice da su životinje termodinamički neučinkoviti sustav za proizvodnju hrane. Za proizvodnju jedne kalorije govedine, govedo mora pojesti 23 kalorije hrane, koja bi se inače mogla koristiti za direktnu ljudsku potrošnju. Drugim riječima, prema autorici knjige *“Diet for a small planet”*, za cijenu stočne hrane potrebne za proizvodnju tipičnog odreska od 250g, moguće je nahraniti 45-50 gladnih ljudi šalicom kuhanih žitarica. Pored svega, sigurnost mesnih proizvoda je upitna, počevši od fekalne kontaminacije koja je toliko sveprisutna da je mesna industrija, znajući da je uzrok problema nerješiv, godinama lobirala da se meso ozračuje prije dolaska do potrošača (Shapiro, 2018). Konvencionalno meso je, nadalje, najčešći uzrok potencijalno fatalnih infekcija, uzrokovanih bakterijama poput *Listeria* i *Salmonella*. Takve bakterije nerijetko evoluiraju u superbakterije - bakterije koje su razvile otpornost na konvencionalne antibiotike. Preširoka upotreba antibiotika omogućuje malom broju vrsta bakterija prirodno imunom na određeni ili

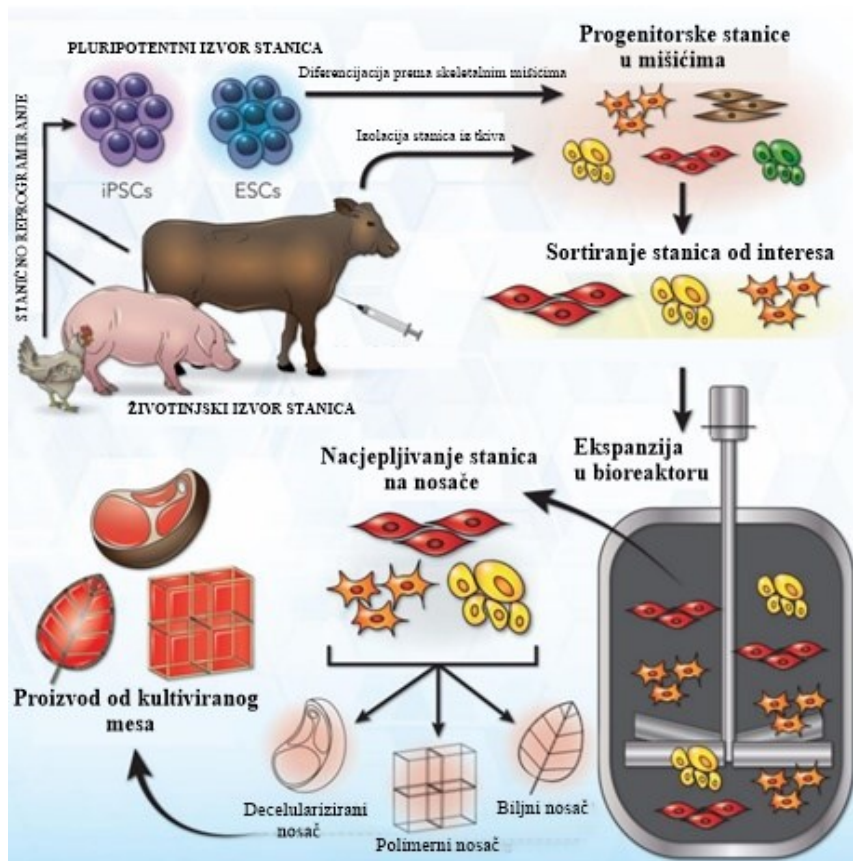
sve antibiotike da se umnože i tako postanu dominantne vrste bakterija u određenoj populaciji. Ovaj problem je itekako relevantan jer se 80% svih antibiotika administrira stočnim životinjama (Landers i sur., 2012). S obzirom da protiv takvih bakterija nema lijeka, do 2050. se očekuje smrtnost od 10 milijuna ljudi godišnje kao direktne posljedice zaraze superbakterijama. Stavimo li to u perspektivu, imajući na umu da je u 2 godine zbog Covida-19 u svijetu preminulo 5.3 milijuna ljudi, jasno je da je očekivana smrtnost zbog superbakterija gotovo 4x veća od Covida-19. Istraživanje provedeno 2014. od strane američke nezavisne organizacije *Consumer reports* (2014) na uzorku od 300 pilećih prsa pronašlo je da je 97% uzoraka sadržavalo opasne bakterije poput *Salmonella*, *Campylobacter* i *E. coli* te da je oko pola njih sadržavalo barem jednu bakteriju otpornu na 3 ili više uobičajeno prepisanih antibiotika, a više od polovice sadržavalo je i fekalnu kontaminaciju. Kako bi maksimizirali njihovu učinkovitost, farmeri životinje drže u malim, skućenim prostorima, idealnima za širenje raznih patogena. Na taj način industrija igra ulogu i u nastanku novih virusa. Naime,  $\frac{3}{4}$  svih zaraznih bolesti u ljudi dolazi od životinja (CDC, 2021).

Unatoč godinama zalaganja organizacija za prava životinja, postotak vegetarijanaca je stagnirao na oko 2 do 5 % u posljednjih 3 desetljeća (Shapiro, 2018). Jasno je da je potreban nov i inovativan pristup ovome problemu. Alternativni proteini, pri čemu se primarno misli na mesne nadomjeske na biljnoj bazi te kultivirano meso, mogu igrati vodeću ulogu u revoluciji prehrambene industrije tako što značajno mogu smanjiti emisije stakleničkih plinova dok u isto vrijeme osloboditi značajne količine obradivog zemljišta koje se, zauzvrat, može iskoristiti za dodatne strategije za ublažavanje klimatskih promjena te očuvanja biološke raznolikosti. Umjesto korištenja zemljišta za uzgoj hrane za stoku te dodatnog zemljišta za uzgoj same stoke, ta zemlja se može prenamijeniti za uzgoj hrane za direktnu ljudsku potrošnju ili za sirovine za proizvodnju kultiviranog mesa, koje, u odnosu na konvencionalno meso, ima značajno manji omjer pretvorbe sirovina u hranu. Trenutno je znanstveno stajalište da mesni nadomjestak na biljnoj bazi koristi do 99 % manje zemljišta nego konvencionalno proizvedena govedina, dok kultivirano meso može koristiti 95 % manje (Sinke i Odegard, 2021). Tranzicija na održive izvore proteina ima potencijal smanjiti emisije za 14-20 % od onoga potrebnog za ispunjavanje zahtjeva Pariškog sporazuma, što je 10-14 gigatona ekvivalenta CO<sub>2</sub> manje godišnje. Taj mitigacijski potencijal uključuje redukciju emisija kao utjecaja smanjene deforestacije zbog uzgoja stoke i njihove hrane te smanjene direktne emisije iz sektora, a ne uključuje sekvestaciju CO<sub>2</sub>, koja bi također doprinijela sa smanjenih 5 gigatona CO<sub>2</sub> godišnje (Hayek i sur., 2020). Međutim, s obzirom da industrija kultiviranog mesa sadrži brojna, znanosti dosad nerješiva

pitanja da bi dosegla skalu dovoljnu za široku komercijalizaciju proizvoda (o kojima će biti riječi kasnije), naspram premija proizvoda, dostupnih u samo odabranim restoranima (trenutno jedino komercijalno dostupno kultivirano meso je kultivirana piletina firme „Eat Just“ u singapurskom restoranu), postavlja se logičko pitanje zašto svu pažnju ne usmjeriti na mesa na biljnoj bazi? Odgovor je jednostavan: problem industrije životinjskih proizvoda je toliko velik da mu treba pristupiti s raznih uglova, kao što današnje održive alternative fosilnim gorivima uključuju solarne, geotermalne i vjetrom proizvedene izvore energije. Osim legislativnih problema u nazivlju proizvoda, upitno je bi li proizvodi na biljnoj bazi, koliko god okusom bili slični, od strane potrošača ikada dobili kulturološku konotaciju mesa, dok je kultivirano meso upravo to – meso.

## **2.2. PROCES PROIZVODNJE KULTIVIRANOG MESA**

Kultivirano, čisto ili *in-vitro* (eng. *cultured/cultivated/clean*) meso (laboratorijski uzgojeno, kao naziv, se izbjegava zbog negativne percepcije potrošača i jer na industrijskoj skali neće biti uzgajano u laboratorijima već u prehrambenim postrojenjima nalik pivovarama (Shapiro, 2018) je pravo životinjsko meso proizvedeno kultivacijom životinjskih stanica. Čisto meso nastoji replicirati konvencionalno proizvedeno meso u svakom pogledu, tako da se posebna pažnja usmjerava na pravilne tipove i raspodjelu stanica kao što su u životinjskom tkivu, a također i na senzorne (primarno gustativne što uključuje i teksturu, ali i vizualne te oflaktivne karakteristike) i nutritivne karakteristike mesa. Mimika i učinkovitost su dva ključna zahtjeva koje ova nova tehnologija mora ispuniti kako bi proizvodnja dostigla komercijalnu skalu. Kako bi postalo “novo normalno” meso mora imati okus identičan ili bolji te cijenu jednaku ili nižu od konvencionalnog mesa. Naspram konvencionalnog uzgoja, ne uključuje usmrćivanje životinje, već se stanice biopsijom prikupljaju iz tkiva žive životinje, iako je i *post-mortem* prikupljanje stanica moguće. Kulture preuzete na ove načine nazivaju se primarne kulture stanica (Freshney, 2016). Alternativno, mogu se koristiti pluripotentne matične stanice, poput embrionskih matičnih stanica (ESC) ili induciranih pluripotentnih matičnih stanica (iPSC). I s primarnim i s pluripotentnim stanicama, ponekad je poželjno provesti sortiranje stanica u svrhu izolacije onih s poželjnim fenotipom (slika 1).



**Slika 1.** Shematski prikaz proizvodnje kultiviranog mesa (Reiss i sur., 2021)

Iako je meso kompleksno tkivo sačinjeno od približno 90% mišićnih vlakna, 10% masti i vezivnog tkiva te manje od 1% krvi, trenutno se većina proizvodnje bazira na korištenju skeletnih mišićnih stanica te adipocita, za koje se smatra da su minimalne potrebne komponente za rekapitulaciju mesa *in-vitro* (Reiss i sur., 2021; Post i sur., 2020). Dodatno, moguće je koristiti primarne stanične linije iz specifičnih organa ili tkiva za proizvodnju mesa organa, npr. *foie gras* izveden iz hepatocita (Shapiro, 2018), ili ostalih organa npr. riblji plivači mješur. Tijekom rane faze kulture stanica, prioritet je održati stanice u stadiju proliferacije kako bi se dobio velik broj stanica koji se može koristiti za proizvodnju prikladne mase kultiviranog mesa (Reiss i sur., 2021). Općenito, sam proces proizvodnje može se podijeliti na 2 faze: proliferacija - gdje je cilj dobivanje što većeg broja stanica iz početne šarže stanica te diferencijacija i sazrijevanje stanica - stanice se najepljuju na nosače te tamo sazrijevaju, a zatim se inducira proizvodnja što većeg broja proteina (stanje hipertrofije) (Džisalov i sur., 2021). Kako bi se postigla ekspanzija na velikoj skali, bioreaktor je ključan uređaj za održavanje velikog broja stanica funkcionalnim, dok istodobno omogućuje difuziju nutrijenata i mehaničku stimulaciju stanica i/ili nosača potrebnu za osnaživanje i pravilno usmjeravanje stanica, odnosno tkiva.

Tehnike koje se koriste za uzgoj čistog mesa primarno su preuzete iz tkivnog inženjerstva, područja koje se oslanja na 3 ključne tehničke komponente: stanice, stanični signali i nosači. Primarna funkcija nosača je pružanje strukturalne podrške te sazrijevanje stanica (Reiss 2021). Međutim, s obzirom da je tkivo načinjeno u biomedicinske svrhe tradicionalno optimizirano za poboljšanu uspješnost transplantacije te što manji imunوسي odgovor, bit će potrebno adresirati specifične razlike koje se javljaju kod proizvodnje kultiviranog mesa, od kojih se najviše ističe okus. Naime, meso sadrži nekoliko tisuća molekula koje doprinose okusu (amino kiseline, hemoproteini, sumporni i karbonilni spojevi, lipidi, kratki peptidi i dodatne hlapive supstance) (Ben-Arye i sur., 2020).

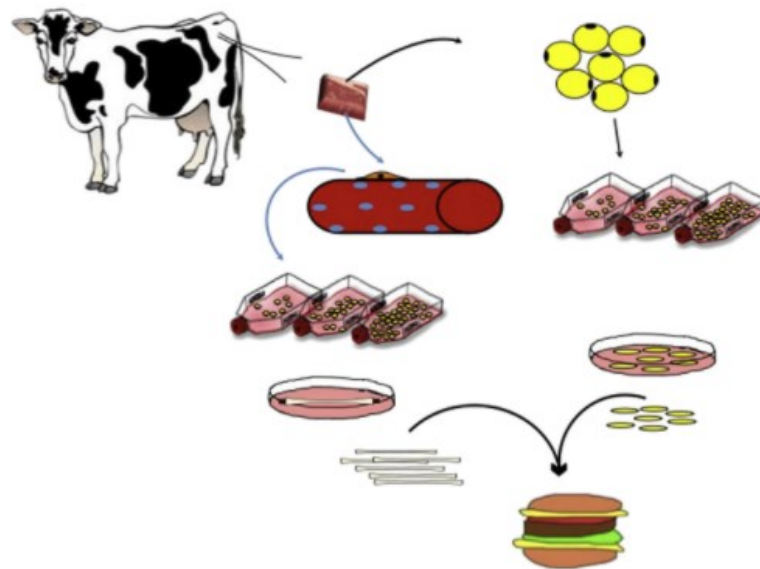
### **2.3. STANIČNE LINIJE**

Pravilan odabir staničnih linija je iznimno bitan jer on diktira velik broj krajnjih karakteristika proizvoda (eng. *downstream* varijable) uključujući okus, teksturu i izgled. Za početne stanice je najpoželjnije odabrati one sa kapacitetom samo obnavljanja i sposobnošću diferencijacije u tipove stanica koje stvaraju mišićno (ili adipocitno/vezivno) tkivo. Samo obnavljanje se definira kao sposobnost stanice za kontinuiranu replikaciju i proliferaciju, pritom zadržavajući potencijal diferencijacije u 1 ili više tkivnu lozu (Freshney, 2016). Matične stanice ispunjavaju sve potrebne karakteristike, stoga su one najčešći odabir za početak proizvodnje. Postoje 2 glavna tipa matičnih stanica pogodnih za proizvodnju čistog mesa: odrasle matične stanice i pluripotentne matične stanice. Sve poznate tehnike baziraju se na korištenju matičnih stanica, ali postoje 3 različita početna pristupa *in-vitro* miogenezi: kultura mišićnih matičnih stanica (satelitnih stanica), usmjerena diferencijacija pluripotentnih stanica te direktno reprogramiranje korištenjem transgeneze. Neki od primjera uspješno provedenih izolacija satelitnih stanica uključuju one porijeklom iz goveda (Post i van der Weele, 2014) i svinje (Ding i sur., 2017). Učinkovita derivacija stabilnih pluripotentnih matičnih stanica također je demonstrirana na govedu (Bogliotti i sur., 2018), a Genovese i sur. (2017) uspješno su pokazali mogućnost induciranih pluripotentnih matičnih stanica (iPSC) porijeklom iz svinje da tvore skeletne miotubule.

#### **2.3.1 Odrasle matične stanice**

Odrasle matične stanice su nediferencirane progenitorske stanice koje obitavaju u specifičnim organima i tkivima u životinja te su najčešći izbor za proizvodnju kultiviranog mesa (Reiss i sur., 2021). Te stanice su multipotentne, što znači da se mogu diferencirati u različite tipove

stanica u specifičnoj lozi stanica, ali su više limitirane od pluripotentnih, odnosno totipotentnih, koje imaju sposobnost diferencijacije u stanice svih triju slojeva zametnih listića (npr. embrijske matične stanice. U neposrednoj blizini skeletnog mišićnog tkiva prisutne su 3 ključne progenitorske matične stanice (stanice potomci matičnih stanica) za proizvodnju kultiviranog mesa: mišićne satelitne stanice, koje su korištene za proizvodnju prvog kultiviranog hamburgera (Post i van der Weele, 2014) , mezenhimalne matične stanice (MSC; stromalne, odnosno stanice koje sačinjavaju vezivno tkivo) te fibroadipogeni progenitori (FAP). U kombinaciji, MSCs, FAPs i satelitne stanice mogu konstituirati sva stanična tkiva prisutna u mesu. Međutim, u svrhu korištenja minimalno resursa, dovoljno je koristiti satelitne stanice i adipocite za povoljnu rekapitulaciju mesa. Post i van der Weele (2014) opisuju metodu proizvodnje malih volumena goveđeg hamburgera koristeći matične stanice izvedene iz adipoznog tkiva krave (ASCs od eng. *adipose tissue derived stem cells*) te satelitne mišićne stanice (slika 2). Oba tipa stanica se najepljuju zasebno na gelove u T-boce, diferenciraju i pomiješaju.



**Slika 2.** Proizvodnja kultiviranog goveđeg hamburgera koristeći adipocite i satelitne stanice (Post i van der Weele, 2014)

### 2.3.2. Satelitne stanice

Mišićne matične stanice (odnosno tzv. satelitne stanice) su prekursori za proizvodnju mišićnog tkiva. Satelitne stanice su najpristupačnije miogenske progenitorske stanice u skeletnom mišićnom tkivu i zahtijevaju malo resursa za diferencijaciju u skeletne miotubule (Post i sur., 2020). Satelitne stanice procesom opredjeljenja stvaraju lako proliferirajuće mioblaste koji se

diferenciraju u miocite. Miociti zatim formiraju multinuklearne miotubule koji se pakiraju u miofibrile. Osim toga, njihova izolacija iz stoke je dobro etablirana (Ding i sur., 2018). Iako se jednostavno dobivaju i mogu se diferencirati u zrele stanice prisutne u mesu, njihov proliferativni kapacitet i održivost su poprilično limitirani *in-vitro* jer proces spontane diferencijacije do miofibrila nije jednostavno zaustaviti. Međutim, postoji nekoliko faktora koje je moguće modificirati kako bi se što duže vrijeme održao proliferativni kapacitet satelitnih stanica. Kod produljenja proliferacije bilo kakvih matičnih stanica, općenito je cilj što bliža rekapitulacija *in-vivo* uvjeta pojedine stanice što primarno uključuje izvanstanični matriks (ECM), signalne molekule (hormoni i citokini), metabolite te okolinu (temperatura, pH i vlažnost) (Choi i sur., 2020). Stoga je supstrat, čija je uloga pružanje površine za usidrenje stanica, bitan faktor za održavanje proliferacije. Kod satelitnih stanica, suplementacija supstrata nekim proteinima iz ECM-a poput fibronektina, laminina i kolagena pomaže u održavanju proliferativnog kapaciteta satelitnih stanica. Specifično, pretjerana ekspresija fibronektina *in-vivo* stimulira ekspanziju satelitnih stanica, dok njegova smanjena količina inducira poremećenu repopulaciju niše satelitnih stanica (Bentzinger i sur., 2013). Kolagen, još jedna od komponenti ECM-a, također igra ključnu ulogu u proliferaciji i diferencijaciji satelitnih stanica. Isključenje kolagena tipa 4 inducira redukciju regenerativnih sposobnosti satelitnih stanica tijekom mišićne ozljede u miševima. U *in-vivo* uvjetima mišićna ozljeda rezultira povećanom proizvodnjom laminina u mišiću što zauzvrat inducira i povećava kapacitet samoobnove satelitnih stanica. Prikazani rezultati su slični i *in-vitro* - satelitne stanice uzgajane na površinama obloženim ECM proteinima pokazuju poboljšane sposobnosti proliferacije i diferencijacije. Studije su pokazale značajna poboljšanja proliferacije korištenjem premaza površina želatinom u svinjskim satelitnim stanicama, kolagena tipa 1 i laminina u mišjim mioblastima, komercijalnog pripravka ECM komponenti *Matrigel* u miogenskim progenitorskim stanicama te svinjskim satelitnim stanicama (Choi i sur., 2020). Drugim riječima, optimalni supstrati uvelike ovise o životinjskoj vrsti iz koje je stanica preuzeta. Stoga, bit će potrebna daljnja istraživanja kako bi se pronašli idealni uvjeti za rast stanica porijeklom iz agrikulturno relevantnih vrsta kako bi proces bio što učinkovitiji. Također, razinu proliferacije je moguće povećati kroz inhibiciju p38-MAPK signalnog puta (Ding i sur., 2018), Setd7 enzima te STAT3 gena. Osim toga, moguće je i sačuvati stanice genetičkom manipulacijom korištenjem, primjerice, CRISPR/Cas9 kompleksa. Nadalje, kod izolacije matičnih stanica moguće je koristiti blagi enzimatski tretman u kombinaciji s trituracijom preostalih mišićnih fibrila što značajno produljuje vrijeme replikacijske faze

stanica (Post i van der Weele, 2014). I na posljetku, neke studije pokazuju da je možda moguće iskoristiti Warburg efekt za stimulaciju proliferacije (raspravljano u nastavku pod “Glukoza”). Sve u svemu, satelitne stanice pružaju najdirektniji način stvaranja skeletnog mišićnog tkiva *in-vitro*, međutim za stvaranje ostalog tkiva, poput adipocitnog, nisu optimalan izbor.

### **2.3.3. Fibroblasti, miofibroblasti, fibroadipogenske progenitorske stanice (FAP), mezenhimalne matične stanice (MSC)**

MSC se najčešće dobivaju iz koštane srži, ali i iz drugih tkiva. Mogu se diferencirati u adipocite, kondrocite i fibroblaste. Fibroadipogenske progenitorske stanice su vrsta mezenhimalnih matičnih stanica. Ne mogu se diferencirati u mioblaste, međutim mogu sekretirati različite faktore rasta i citokine koji mogu povećati miogenezu i miogensku diferencijaciju (Wosczyzna i Rando, 2018). Stoga, vrijedi razmotriti kokultivaciju ili pomiješanu kultivaciju sa satelitnim stanicama. Osim toga, mogu se diferencirati u fibroblaste ili adipocite (tablica 1). FAP stanice također igraju ulogu u akumulaciji fibroblasta i adipocita u vezivnom tkivu, pogotovo u kontekstu bolesti. Zbog toga je moguće da oni koji kultiviraju mezenhimalne matične stanice derivirane iz skeletnog mišićnog tkiva zapravo kultiviraju i fibroblaste, bez specifičnog znanja o tome jer su specifične značajke tih fibroblasta za njihovo definiranje još uvijek nepoznate.

### **2.3.4. Diferencijacija odraslih matičnih stanica**

Diferencijacija satelitnih stanica se obično postiže uklanjanjem faktora rasta ili tretmanom ligandima koji stimuliraju diferencijaciju. Osim toga, prakticira se i suplementacija dušičnim oksidom te arahidonskom kiselinom (Choi i sur., 2020). Najčešće se, pak, koristi “izgladnjivanje” stanica serumom što ih tjera u miogensku diferencijaciju. To uključuje postupno smanjenje količine seruma u mediju. Međutim, s obzirom da je serum problematičan sastojak kultiviranog mesa (diskutirano u nastavku), Messmer i sur. (2022) su u nedavnom radu identificirali površinske receptore satelitnih stanica te suplementirali ligande tim receptorima. To je rezultiralo formulacijom medija za kulturu goveđih satelitnih stanica bez seruma koji inducira diferencijaciju sa sličnim učinkom kao konvencionalni medij sa serumom.

### **2.3.5 Pluripotentne stanice**

Pluripotentne matične stanice (PSC) su grupa stanica koja može beskonačno ostati u proliferativnom stanju te se može diferencirati u gotovo sve stanice u tijelu. Pod ovu grupu



stanica spadaju embrijske matične stanice (ESC) te inducirane pluripotentne matične stanice (iPSC).

### **2.3.6 Embrijske matične stanice**

ESC se dobivaju iz unutarnje stanične mase blastociste koja se stvara nekoliko dana nakon fertilizacije (Freshney, 2016). Sam proces ekstrakcije tih stanica je vrlo izazovan jer su stanice iznimno osjetljive na supstrat te zahtijevaju specifične faktore rasta i inhibitore koji ovise od vrste do vrste. Zbog toga je izvođenje i stabilna propagacija stanica stočnih životinja tek nedavno po prvi puta učinjena (Bogliotti i sur., 2018).

### **2.3.7 Inducirane pluripotentne matične stanice**

Nadalje, moguće je iskoristiti iPSC tehnologiju za induciranje pluripotentnog stanja u gotovo bilo kojoj somatskoj stanici, uključujući one lako dobavljive kao što su bijele krvne stanice ili fibroblasti kože. Induciranje pluripotentnog stanja somatskih stanica izvodi se prekomjernom ekspresijom transkripcijskih faktora poznatih kao Yamanaka faktori: *Oct4*, *Klf4*, *c-Myc*, and *Sox2* (Takahashi i Yamanaka, 2006). Reprogramiranje se može provesti putem virusom posredovane prekomjerne ekspresije navedenih faktora trajnom integracijom u genom ili bez korištenja transgena. Druga opcija je poželjna u svrhu izbjegavanja mogućih poteškoća s dobivanjem regulatornih dozvola za komercijalizaciju kultiviranog mesa. Izbjegavanje transgena je moguće virusnim vektorom, npr. Sendai virusnim vektorom koji se jednostavno eliminira iz stanica, episomalnom ili mRNA isporukom gena, proteina ili malih molekula. iPSC je lakše izvesti nego ESC, a po funkcionalnosti su stanice slične. Iako su generirane iz velikog broja agrigulturalno relevantnih vrsta, daljnja istraživanja su potrebna na morskim životinjama.

### **2.3.8 Diferencijacija pluripotentnih matičnih stanica**

Kao što je već spomenuto, PSC se mogu neograničeno dugo održavati u kulturi putem samo obnavljajuće diobe te se mogu diferencirati u sve somatske stanične linije. Postoje 3 pristupa diferencijaciji ovih stanica. Prvi uključuje korištenje faktora rasta i malih molekularnih inhibitora koji usmjeravaju stanice prema miogenskoj liniji, drugi se zasniva na aktivaciji ektopijski ekspresiranih transkripcijskih faktora (oni faktori čiji gen za njihovu proizvodnju uobičajeno nije ekspresiran u odrasloj stanici) koji programiraju stanicu u miogensku liniju, a zadnja je opcija suplementacija medija i posljedično stanicama ligandima za diferencijaciju (Post i sur., 2020). Alternativno, moguća je i transdiferencijacija, koja omogućuje direktnu konverziju jednog tipa somatske stanice u drugi, bez intermedijarnog pluripotentnog stanja.

Demonstrirana je na mišićima i mastima, međutim nije jasno koliko je ovaj pristup održiv s obzirom da se protokol provodi nakon proliferacije, a dio stanica neizbježno bude neuspješno diferenciran. Usprkos tome, izraelska firma „FutureMeat” vjerojatno koristi ovaj pristup transdiferencirajući fibroblaste, koji imaju sposobnost udvostručenja u manje od 24 sata (otprilike kao i mioblasti). Zanimljivo, izjavili su da postižu gustoću od 100 milijuna stanica po mililitru te da je cijena proizvodnje 453g kultivirane piletine 7.70\$, što je diskutabilno jedna od najniže postignutih cijena proizvodnje kultiviranog mesa.

**Tablica 1.** Pregled relevantnih matičnih stanica za proizvodnju kultiviranog mesa (Reiss i sur., 2021).

	Relevantni stanični tip	Lokacija staničnog tipa <i>in-vivo</i>	Metoda za dobivanje	Prolifera-tivni kapacitet	Diferencijacijski potencijal	Izolirano iz relevantnih vrsta
Izvor stanice	Mišićne satelitne stanice	Ispod bazalne membrane skeletalnih miotubula	Mišićna biopsija	Limitiran	Skeletne miotubule	Govedo Kokoš Ovca Riba Svinja
	Mezenhimalne matične/stromalne stanice (MSCs)	Više lokacija (npr. koštana srž, adipozno tkivo...)	Biopsija tkiva	Limitiran	Adipociti Kondrociti Fibroblasti	Govedo Kokoš Ovca Svinja
	Fibroadipogeni progenitori (FAPs)	Intersticijski prostor skeletnih mišića	Mišićna biopsija	Limitiran	Adipociti Fibroblasti	Govedo Svinja
Pluripotentne matične stanice	Embrionske matične stanice (ESCs)	Unutarnja stanična masa blastociste	Izolacija iz unutarnje stanične mase	Beskonačan	Bilo koji tip stanice	Govedo Kokoš Ovca Riba Svinja
	Inducirane pluripotentne matične stanice (iPSCs)	Nije primjenjivo	Reprogramiranje somatskih stanica	Beskonačan	Bilo koji tip stanice	Govedo Kokoš Ovca Svinja

## 2.4. MEDIJ ZA UZGOJ STANICA

Medij za kulturu stanica je nutritivno bogata tekućina koja je ključna za podržavanje i održavanje rasta stanica *in-vitro*. Ujedno, to je i komponenta kultiviranog mesa koja je najzaslužnija za visoku cijenu proizvodnje. Kompozicija medija će definirati finalne karakteristike proizvoda, stoga je pažljivo biranje količine i vrste sastojaka od iznimne važnosti. Također, bitno je da je medij za proliferaciju različitog sastava od medija za diferencijaciju stanica jer se ovisno o stanju stanice mijenja njihova primarna metabolička aktivnost (npr. različita je proizvodnja specijaliziranih proteina) (Post i sur. 2020). Općenito, medij se sastoji od 2 dijela: bazalni medij i specifični dodani faktori. Bazalni medij sadrži esencijalne nutrijente, obično pufersku otopinu glukoze, anorganskih soli, u vodi topivih vitamina i aminokiselina. Specifični dodani faktori uključuju rekombinantne proteine, faktore rasta, hormone, lipide, antioksidanse itd. (Freshney, 2016). Nutrijenti u mediju se mogu podijeliti na izvore ugljika i izvore dušika čije preuzimanje stanice reguliraju preko njihove dostupnosti, ekstracelularnim signalima i proliferativnim statusom stanica (O'Neill, 2020). U nastavku su ukratko diskutirane bitnije komponente medija te su predstavljene taktike za sniženje cijene.

### 2.4.1 Bazalni medij

Različite formulacije bazalnog medija su se razvijale tijekom vremena. Tako su *Eagle's minimal essential medium* (MEM), *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) i *Ham's F-12* postali zlatni standardi u biotehnologiji životinjskih stanica, iako su razvijani za ljudske HeLa stanice ili specifične stanice glodavaca (O'Neill, 2020).

#### Izvori dušika u mediju

Aminokiseline, primarno glutamin, predstavljaju najznačajnije izvore dušika *in-vitro*. Dušik je ključni element u funkcionalnim i strukturalnim molekulama poput proteina i nukleotida.

#### Aminokiseline

Jedna od najbitnijih komponenti medija su aminokiseline, čija je uloga stvaranje proteina i ostalih komponenti malih molekulskih masa poput nukleotida i malih peptida. Dije se na esencijalne i neesencijalne (*in-vitro* i *in-vivo* esencijalne aminokiseline nisu iste). Stanice različitih životinjskih vrsta zahtijevaju različite esencijalne aminokiseline (O'Neill, 2020). S obzirom da su jedna od najbrojnijih komponenti medija, nužno je održati cijenu proizvodnje

niskom. Moguće metode proizvodnje su ekstrakcija iz proteinskih hidrolizata, kemijska sinteza, mikrobna fermentacija i pročišćavanje, a zadnja predstavlja i najčešće korištenu metodu. Post i sur. (2020) navode kako je proizvodnja aminokiselina najefektivnija kroz fermentaciju, koristeći glukozu kao supstrat. Osim cijene, svakako je potrebno voditi računa da je i utjecaj na okoliš što manji. Alternativni izvori aminokiselina i peptida se također mogu koristiti. Primjer su mikroalge koje zahtijevaju minimalno prostora i resursa, a imaju kapacitet proizvodnje visokovrijednih proteina, a također i masti, vitamina i minerala te im cijena može biti vrlo niska, pogotovo ako se koriste kao dio kružne ekonomije. Usprkos tome, relativno su neistražene (Wang i sur., 2021). Također, potrebna su i daljnja istraživanja vezana za količinu potrebnih aminokiselina. Naime, potrebna količina u pojedinom mediju se određuje prema potrošnji aminokiselina pojedinih stanica te topivosti, stabilnosti i interakciji s drugim komponentama medija poput metalnih kationa što se sve može promijeniti kad je medij kompleksan, s velikim brojem varijabli (Salazar i sur., 2016). Izazov je još veći zbog činjenice da će bioproces s obzirom na aminokiseline morati biti optimiziran za svaku relevantnu životinjsku vrstu i različite stanice. Jedno od rješenja su svakako računalne simulacije. L-glutamin je jedna od najbitnijih aminokiselina u mediju jer je prekursor za intermedijarne molekule koje sadrže dušik i ugljik i koje se koriste za proizvodnju ostalih aminokiselina i nukleotida i moguće ga je dodati u koncentraciji 3-40 x većoj nego ostale amino kiseline u mediju (Yao i Asayama, 2017). Međutim, L-glutamin je iznimno nestabilan pri fiziološkom pH, što uzrokuje njegovu dekompoziciju u piroglutamat i amonijak. S obzirom da je amonijak toksičan za stanice, ne smije biti prisutan u kulturi. Potencijalna rješenja uključuju korištenje glutamata koji je stabilniji te specifični odabir stanica s velikim brojem enzima glutamin sintaze koja može pretvarati glutamat u glutamin, trošeći amonijak u procesu. Druga opcija je dodatak dipeptida u formi alanil-glutamina (GlutaMAX™) ili glicil-glutamina koji su puno stabilniji u kulturi i razina amonijaka je značajno manja (Freshney, 2016). Nedavno istraživanje pokazalo je da kokultivacija životinjskih stanica s mikro algama može doprinijeti značajnom smanjenju količine amonijaka i pomoći kod proizvodnje gušćih, nutritivno bogatih tkiva (Haraguchi i Shimizu, 2021).

### **Izvori ugljika u mediju**

Većina kultiviranih životinjskih stanica, što se izvora ugljika tiče, ne može biokemijski iskoristiti ništa osim glukoze, glutamina i limitiranog broja ostalih aminokiselina i masnih kiselina. Od šećera još mogu iskoristiti i fruktozu, piruvat, maltozu i sukrozu, ali se te

komponente značajno lošije metaboliziraju (O'Neill, 2020). Vanjsko dodavanje masnih kiselina nije potrebno, iako može smanjiti metaboličko opterećenje kod sinteze masnih kiselina.

### **Glukoza**

Glukoza (pogotovo D-glukoza) je najčešći izvor ugljika u kulturama stanica. Industrijski se proizvodi korištenjem enzima amilaze za degradaciju škroba iz kukuruza, krumpira, pšenice i ostalih usjeva. Proces je dobro etabliran, s malim količinama otpada i malim energetske gubicima (Post i sur., 2020). Tijekom perioda proliferacije, čak i s dovoljnim količinama kisika, iz glukoze može nastati laktat, još jedan produkt toksičan za stanice (Warburg efekt). Drugim riječima, dio glukoze se ne oksidira potpuno do CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>O, već se proizvodi laktat. Kroz Warburg efekt se stvara nekoliko metabolita koji su korisni proliferirajućim stanicama (O'Neill, 2020). Glukoza ulazi u stanicu pomoću transportnih proteina na površini stanice, koristeći ili pasivan transport niz koncentracijski gradijent ili aktivni transport uz utrošak ATP-a. U stanici se koristi kao primarni izvor energije formirajući ATP kroz glikolizu (uz pomoć kojeg se stvaraju biomolekule poput masnih kiselina, aminokiselina i nukleotida), ali i kao reduktivni agens protiv oksidativnog stresa tako što generira NADPH kroz pentoza fosfatni ciklus. *In-vitro* se koristi pri koncentracijama 5,5-55 mM, ovisno o tipu i stadiju stanica (proliferacija ili diferencijacija).

### **Anorganske soli**

Korištenje anorganskih soli omogućava održavanje osmolarnosti unutar i izvan stanice u mediju te kao enzimatski kofaktori i bitne komponente staničnih receptora i ECM proteina. Ove anorganske soli su sastavljene od kationa i aniona koji se otapaju u otopini. Originalni medij sadržava 6 anorganskih soli (CaCl<sub>2</sub>, KCl, MgSO<sub>4</sub>, NaCl, Na<sub>2</sub>PO<sub>3</sub>, NaHCO<sub>3</sub>). Ostale formulacije uključuju i druge anorganske soli poput cinka, bakra i željeza koje imaju bitnu ulogu u različitim staničnim funkcijama. Svaka stanica ima određeni potencijal membrane u mirovanju, međutim podražljive stanice poput skeletnog mišićnog tkiva su osobito osjetljive na promjene u ionskim koncentracijama, stoga na tržištu postoje razvijene formulacije medija specifične za skeletno mišićno tkivo.

### **Vitamini**

Vitamini su ključni za rast i održavanje stanica. Većinu vitamina je potrebno dodati direktno u medij, s nekoliko iznimki (npr. fibroblasti sami sintetiziraju vitamin D). Dijeleg se na topive u

vodi i topive u mastima. Uloga u stanici im je kao enzimski kofaktori, antioksidansi i hormoni. Apsorpcija *in-vivo* je kompleksna, primarno zbog različitih okolina i uvjeta poput pH na putu do intestinalnog trakta. U nedostatku problematičnih okolina (kao što je barijera krv-mozak), *in-vitro* suplementacija je relativno jednostavna i stanice direktno procesiraju kemijski dodatak. Industrijski se proizvode mikrobnom fermentacijom, međutim potrebna su poboljšanja kako bi se smanjila cijena i povećala efikasnost. Iz tog razloga se neki proizvode kemijskom sintezom (Acevedo-Rocha i sur., 2019).

### **Puferi**

Puferi su esencijalni u mediju jer bi bez njih stanice rapidno odumirale zbog naglih promjena u potencijalu membrane uzrokovanih promjenom pH, što bi posljedično utjecalo i na osmotski pritisak stanica. U kulturi stanica, obično se koriste bikarbonatni puferi (CO<sub>2</sub>) ili puferski agensi poput HEPES-a (Freshney, 2016). Bikarbonatski sustav se obično egzogeno inkorporira dodajući 5-10 postotni plinoviti CO<sub>2</sub>. Promjene pH prirodno nastupaju zbog respiracije stanica i zbog otpuštanja CO<sub>2</sub>, koji u otopini stvara H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> te zbog formiranja laktata metabolizmom glukoze. Zbog toga dodani natrijev bikarbonat mora biti proporcionalan atmosferskom CO<sub>2</sub>. Korištenjem bikarbonata javljaju se i određeni problemi pri velikim skalama. Naime, kod proliferacije velikog broja stanica, razina H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> u otopini može dostići za stanicu kobne razine. Zbog toga se često preferira kultiviranje pri atmosferskom CO<sub>2</sub> s HEPES-om, koji je dvopolarizirani ionski pufer i ima malu toksičnost i visoku topivost. Nadalje, puferi su jedan od najskupljih sastojaka bazalnog medija, uključujući i HEPES, pa posebnu pozornost treba posvetiti održivosti na velikim skalama (Specht, 2020). Međutim, predviđa se da će na velikoj skali biti dovoljni i obični bikarbonatni puferi zbog striktne kontrole CO<sub>2</sub> u bioreaktorima (O'Neill, 2020).

### **2.4.2 Serum**

Bazalni medij je dovoljan da stanice ostanu žive neko vrijeme, ali ukoliko je potrebna proliferacija dulje vremena potrebne su komponente prisutne u životinjskom serumu (najčešće se koristi fetalni goveđi serum). Serum je visokoproteinska mješavina koja sadrži faktore rasta, faktore vezanja stanica, hormone, antioksidanse, lipide i ostale komponente koji oponašaju fetalno stanje *in-vivo*. Oponašanje seruma kemijski sintetiziranim faktorima, zbog nepoznatog točnog sastava seruma (diskutirano pod "Fetalni goveđi serum"), je iznimno zahtjevno i razlikuje se prema staničnom tipu i vrsti životinje (van der Valk i sur., 2018).

### **Fetalni goveđi serum (FBS od eng. *fetal bovine serum*)**

FBS se prikuplja iz krvi fetusa, koji se vade iz trudnih krava te se smatra nusproizvodom mesne industrije (van der Valk i sur., 2018). Iako se rutinski koristi za poboljšanje rasta velikog broja stanica, postoji niz problema povezan s njegovim korištenjem. Kao prvo, kompozicija se razlikuje od šarže do šarže, tako da je pravi sastav seruma nepoznat. Razlog tomu je razlika ishrane krava, razlika geografskih područja na kojima obitavaju, gestacijska dob fetusa itd. To dovodi do nemogućnosti reproducibilnosti eksperimenata i do velikih troškova u rigoroznoj kontroli kvalitete svake šarže. Nadalje, potencijalan je izvor kontaminacije velikim brojem mikroorganizama. Mikroorganizmi uključuju viruse, mikoplazme i prione koji uzrokuju bolest kravljeg ludila. Određene države poput SAD-a nemaju zabilježenih slučajeva zaraza serumom s tim prionima, tako da one imaju mogućnost držanja tržišne cijene seruma visokom (Schnitzler i sur., 2016). Serum je inherentno neodrživa solucija. Polje stanične terapije dobiva sve više dozvola za korištenje seruma, tako da potražnja raste, ali s obzirom da se serum smatra nusproizvodom, farmeri ne dobivaju nikakve dodatne prihode od njega, već sve prihode zadržavaju klaonice. Zbog toga cijene seruma naglo skaču (povećanje više od 300% tijekom zadnjih nekoliko godina). Nadalje, proces prikupljanja seruma uključuje uklanjanje fetusa iz kravlje utrobe i vađenje krvi tako da se zabije igla direktno u srce, jer je to jedina lokacija u tijelu u kojoj nema zgrušane krvi. S obzirom da je do tada živčani sustav teleta već razvijen, vjerojatno osjeća iznimnu bol (van der Valk i sur., 2018). Zbog svih navedenih razloga je apsolutni imperativ industrije kultiviranog mesa da se pronade adekvatna zamjena za serum.

### **2.4.3 Zamjena za serum**

Uobičajena praksa je da se medij bez seruma za biofarmaceutsku industriju ili medicinska istraživanja suplementira skupim faktorima rasta (posebno inzulin, FGF2 i TGF $\beta$ ) koji se proizvode rekombinantno ili izoliraju iz životinjskog seruma. Druga opcija je, naravno, neodrživa za industriju čistog mesa. U tradicionalnim proizvodnji životinjskih stanica, često se koristi Essential 8™ medij ili Fibroblast Growth Medium™ dizajnirani za proliferaciju ljudskih pluripotentnih matičnih stanica i ljudskih primarnih fibroblasta, respektivno. Kao primjer formulacije medija bez seruma, Essential 8™ temelji se na bazalnom mediju DMEM/F12 te sadrži 7 preostalih sastojaka: aminokiseline, vitamine, anorganske soli, ugljikohidrate, lipide, faktore rasta i grupu “ostalih” sastojaka koja uključuje fenol crveno za indikaciju pH (O’Neill i sur., 2020). Navedena 2 medija su uspješno korištena za proliferaciju primarnih goveđih mioblasta u trajanju od 6 dana, međutim postignuto je samo 1 udvostručenje

stanica (Kolkmann i sur., 2020). Također, korištenje takvog medija na velikoj skali bi bilo prohibitivno skupo. Usprkos tome, brojne kompanije kontinuirano izjavljuju kako uspijevaju formulirati vlastite stanične medije bez seruma (npr. Mosa Meat). To daje naslutiti da je moguće razvijen velik broj specifičnih formulacija medija bez seruma koji su intelektualno vlasništvo svake firme.

### **Endogena proizvodnja faktora rasta**

Potencijalno obećavajuća tehnologija za proizvodnju faktora rasta je i genetički inženjering stanica tako da same endogeno proizvode proteine. Međutim, potrebno je dodatnih istraživanja kako bi se minimizirala cijena, a osim toga dobivanje ranije spomenutih regulatornih dozvola moglo bi biti izazovno.

### **Lizati ljudskih trombocita**

Druga moguća metoda je korištenje ljudskih lizata trombocita koji su nusprodukt doniranja krvi (van der Valk i sur., 2018). Oni sadrže mnoštvo faktora rasta, citokina i faktora vezivanja stanica. No brojna pitanja ostaju otvorena kod ovog pristupa: kompatibilnost među vrstama, cijena i logistika opskrbe.

### **Biljni ili fungalni homolozi faktorima rasta**

Proteinski ekstrakti biljaka ili gljiva možda mogu poslužiti kao faktori rasta i regulatorni proteini kod kultiviranog mesa.

### **Kondicionirani medij**

Ovaj pristup temeljno uključuje recikliranje i koncentriranje faktora rasta koje životinjske stanice same proizvode u spojenom sustavu bioreaktora. Točnije, kondicionirani medij je medij koji sadrži biološki aktivne komponente dobivene od prethodne kultivacije stanica koje su ispustile supstance koje utječu na stanične funkcije poput rasta.

#### **2.4.4 Antibiotici**

Antibiotici kod proizvodnje čistog mesa će se izbjegavati na velikoj skali. Razlozi tomu su slični kao i za već postojeće industrije životinjskih stanica: promovira lošu aseptičku tehniku, dovodi do stvaranja superbakterija, mnogim organizmima je rast inhibiran, ali ih se ne ubije što dovodi do suptilne kontaminacije, ne može se ukloniti mikoplazma te može utjecati na stanične procese (Freshney, 2016). Također, u industriji kultiviranog mesa je također apsolutno nepoželjno da u završnom proizvodu bude rezidualnih antibiotika zbog zdravlja potrošača.



Kultivirano meso bez antibiotika je jedan od velikih pluseva zbog kojih bi potrošači u budućnosti mogli odabrati kultivirano meso naspram konvencionalnog.

#### **2.4.5 Područja koja zahtijevaju dodatna istraživanja**

1. Optimizirane formulacije medija bez životinjskih sastojaka za stanice morskih životinja.
2. Optimizacija za kopnene životinje. Primjer da su optimizacije potrebne vidljiv je i na primjeru DMEM medija, koji sadrži ekscesivan broj aminokiselina koje su skupe, ali je svejedno široko korišten u industriji kultiviranog mesa na laboratorijskoj skali (O'Neill, 2020). Uspješne formulacije medija sa značajno manjim cijenama mogu pružati putokaz za buduća istraživanja.
3. Sniženje cijene. Npr. Kuo i sur. (2020) su uspjeli formulirati medij cijene svega 3% konvencionalne cijene, atribuirajući svoj uspjeh primarno vlastoručnoj proizvodnji rekombinantnih proteina koristeći *E. coli* kao organizam za ekspresiju proteina (Kuo i sur., 2020). Također, nizozemska firma Mosa Meat je izjavila u srpnju 2020. da su smanjili cijenu medija više od 80 puta od originalne formulacije, a u svibnju 2021. da su smanjili cijenu medija za adipocite više od 65 puta. Štoviše, iako je značajno smanjenje cijene medija izazovno, prijašnji primjeri dokazuju da je i moguće. Jedna analiza čak pokazuje da je smanjenje cijene medija moguće za 99,99% (Specht, 2020). Međutim, pitanje ostaje koliko je moguće na velikoj skali, koje kultivirano meso pokušava postići. Humbird (2021) izjavljuje da čak i kad se riješe inženjerski problemi vezani uz proizvodnju kultiviranog mesa na velikoj skali, limitirajući faktor bit će cijena medija, osobito zbog cijene aminokiselina na tolikoj skali. Međutim, ostale tehnokonomske analize su optimističnije, Sinke i Odegard (2021) predviđaju da se aminokiseline mogu skalirati da koštaju 0,40\$/kg, a Risner, i sur. (2020) ih modeliraju na 0.24\$-3.12\$/L, dok je Humbirdova projekcija da će cijena biti 3.39\$/kg. Nadalje, recikliranje medija se istražuje kao metoda za smanjenje troškova, ali još ne na kulturama životinjskih stanica. Uspješno je već demonstrirana u bakterijskim i algalnim kulturama. Post i sur. (2020) predviđaju da bi ta metoda u kombinaciji s perfuzijom značajno mogla smanjiti korištenje sterilne pročišćene vode koja je vrlo energetski intenzivan resurs.
4. Etablirane stanične linije moraju biti prilagođene novim formulacijama medija bez seruma što se radi postupnim smanjenjem seruma u mediju i postupnim dodavanjem novog medija bez seruma. Taj proces nije jasno karakteriziran za mišićne matične stanice. Stoga, od kritičnog je značaja osigurati što više staničnih linija sa smanjenim potrebama za komponente seruma

(O'Neill i sur., 2020).

## **2.5. NOSAČI**

Nosači su ključna komponenta stanične agrikulture koja služi kao integrirana mreža za podržavanje rasta i diferencijacije stanica. Na njih se stanice usidre što značajno poboljšava rast stanica, a pogotovo je ključno kod onih stanica koje su ovisne o usidrenju. Naime, s obzirom da se stanice kad su u velikim bioreaktorima nalaze u neprirodnom okruženju, one ovisne o usidrenju bit će pod velikim rizikom od Anoikisa, odnosno programirane stanične smrti uslijed odvajanja od ekstracelularnog matriksa. Stoga, snabdijevajući stanicama supstrat u formi nosača omogućuje rast i proliferaciju. Alternative za izbjegavanje anoikisa kod stanica ovisnih o usidrenju uključuju korištenje staničnih linija adaptiranih na rast u suspenziji, kultivaciju u obliku sferoida ili korištenje molekula poput inhibitora rho-kinaze. Nosači omogućavaju protok kisika i hranjivih tvari što pomaže da se održe metaboličke funkcije. U povijesti su se razvijali za tkivno inženjerstvo i regenerativnu medicinu, stoga je za staničnu agrikulturu potreban različiti set kriterija: moraju biti sigurni za konzumaciju kuhani i nekuhani, moraju biti ili razgradivi ili ukusni za konzumaciju i imati poželjna nutritivna svojstva. Osim toga, moraju biti termički stabilni, ekonomični i mora ih se moći proizvoditi na velikoj skali (Post i sur., 2020). S obzirom da se asortiman konvencionalnih mesnih proizvoda može promatrati u spektru strukturne sofisticiranosti (npr. hrenovke, mljeveni proizvodi poput hamburgera i odresci), na isti način valja promatrati i kultivirane proizvode. Odabir nosača ovisit će o željenoj kompleksnosti strukture.

Kako se milijarde matičnih stanica diferencijacijom pretvaraju u strukturirano meso? Ključna komponenta je izvanstanični matriks.

### **2.5.1. Ekstracelularni matriks**

*In-vivo*, stanice se nalaze u okruženju složene matrice izlučenih proteina i proteoglikana koja se naziva izvanstanični matriks (ECM). ECM ima svojstvenu krutost koja zauzvrat može utjecati na staničnu aktivnost preko specijaliziranih proteina stanične membrane koji se nazivaju integrini. Integrini djeluju kao “mehanosenzori” tj. proteini za prijenos informacija iz izvanstaničnog matriksa u intracelularni aktomiozinski citoskelet. Te informacije se prenose mehanotransdukcijskim signalnim putovima te utječu na niz nizvodnih staničnih odgovora. u stanici-matriksu adhezijski kompleksi povezuju citoskelet aktomiozina s izvanstaničnim matriksom (fokalni adhezijski kompleksi). Ove veze posreduju u sposobnosti stanice da osjeti

izvanstanični okoliš, što dovodi do signalizacije nizvodno koja može utjecati na polaritet stanice, migraciju i diferencijaciju (Sun i sur., 2016.). Ovaj proces se naziva mehanotransdukcija. Tijekom embriogeneze i razvoja stanica, one se množe i diferenciraju djelomično zbog znakova iz svoje izvanstanične okoline. Dodatni čimbenici kao što su ECM gustoća i gradijenti, sastav i 3D topografija mogu imati veliki utjecaj na ponašanje stanica (Bomkamp i sur., 2022). U biti, kako stanice postaju definirane, njihovi obrasci ekspresije gena diktiraju stvaranje i izlučivanje specifičnih komponenti ECM-a, koje zauzvrat djeluju kao povratni mehanizam za daljnje diktiranje stanične diferencijacije i migracije, proces koji se naziva "dinamički reciprocitet". Regulacija i održavanje matičnih stanica u odraslom tijelu je uvelike ovisno o ECM komponentama koje određena niša matičnih stanica sadrži, gdje niša svakog tkiva tipično sadrži unikatne ECM komponente. Ključno je da se oponašanjem *in vitro* krutosti ECM-a i proteinskog sastava određenog mikrookoliša niše matičnih stanica, matične stanice mogu diferencirati u predvidljive linije.

### **2.5.2. Biomaterijali za nosače**

Biomaterijali za nosače su ključan element stanične agrikulture koji služi kao integrirana mreža na koje se stanice pričvršćuju. Materijali koji se koriste za nosače vjerojatno će morati biti u izobilju, pristupačni, jeftini i sigurni. Neki primjeri uključuju polisaharide poput hitozana, alginata ili celuloze, proteine poput zeina ili složene kompozite poput lignina ili tekstiriranog biljnog proteina. U svrhu smanjenja troškova, manipulacija biološki izvedenog materijala treba biti minimalna. Proizvodi iz tradicionalne animalne agrikulture poput kolagena se trebaju izbjegavati jer bi to podrazumijevalo ovisnost o intenzivnom uzgoju stočnih životinja (Post i sur., 2020). Tablica 2 daje pregled relevantnih polimernih opcija biomaterijala za nosače staničnu agrikulturu. Javne baze podataka o biomaterijalima i njihovim svojstvima mogu pomoći pri odabiru materijala za obećavajuće nosače i metoda za njihovu izradu.

**Tablica 2.** Relevantne opcije polimera za proizvodnju nosača za staničnu agrikulturu (Post i sur., 2020)

<b>Klasa biopolimera</b>	<b>Specifični tip</b>	<b>Izvor i značajke</b>
Polisaharidi	Celuloza i njeni derivati	Biljke, bakterije
	Škrob (amiloza, amilopektin)	Biljke
	Hitin/kitozan	Rakovi, insekti, gljive, plijesni
	Hijaluronska kiselina, derivati metakrilata	Heterologna ekspresija
	Alginat	Biljke
	Agaroz	Biljke
Proteini	Kolagen/želatina, zein, derivati metakrilata	Heterologna ekspresija
	Svila	Dudov svilac, pauci, heterologna ekspresija
	Elastin	Heterologna ekspresija
	Keratin	Heterologna ekspresija
	Laminin	Heterologna ekspresija
Poliesteri	Polihidroksialkanoati	Heterologna ekspresija
Sintetski	Polilaktičke/poliglikolne kiseline	Kemijska sinteza
	Polikaprolakton	Kemijska sinteza
	Polietilen glikol	Kemijska sinteza
	Polivinilalkohol	Kemijska sinteza
Kompleksni prirodni kompoziti	Micelij	Gljive
	Lignin	Biljke
	Decelularizirano tkivo	Biljke
	Sojini hidrolizati	Biljke

### 2.5.3. Tehnike izrade nosača

Materijali se mogu sastaviti postojećim tehnikama uključujući 3D ispis, tehnologije pređenja polimera kao što je elektropredenje, decelularizacija, prilagodljivi hidrogelovi ili čak sama priroda (npr. gljivični micelij). Nekoliko B2B tvrtki, koje se razlikuju po izboru materijala ili načinu montaže, imaju za cilj opskrbu industrije nosačima. Vjerojatno će se osnovati i mnoge druge. Odabir nosača i njezina svojstva uvelike će ovisiti o konačnom proizvodu, pri čemu nosač ima sve važniju ulogu u strukturiranim proizvodima. Nosači mogu biti namjerno dizajnirani da budu biorazgradivi tako da se zamijene nativnim izvanstaničnim matriksom do vremena kada se proizvod sakupi. Alternativno, nosači mogu činiti značajan dio konačnog proizvoda, stvarajući hibridni proizvod.

### 2.5.4. Mikronosači

Mikronosači su male strukture nalik kuglicama, obično promjera 100-400 $\mu$ m koje dopuštaju pričvršćivanje stanica oponašanjem karakteristika ECM-a kao što su krutost, topografija i poroznost. Prednost korištenja mikronosača u bioreaktorskoj kulturi leži u tome da daju veliki omjer površine i volumena, dopuštajući veliku gustoću stanica u odnosu na 2D kulturu i mogu se koristiti u fleksibilnim (npr. šaržnim, šaržnim dovodom, perfuzijskim) i kontroliranim cjevovodima za bioproces. Ekspanzija stanica pomoću ovih stanica je relativno jednostavna, bilo dodavanjem više mikronosača gdje se stanice podvrgavaju prijenosu zrna na zrna (*bead to bead transfer*) (Verbruggen i sur., 2018) ili putem enzimske disocijacije i transfera stanica u veće spremnike putem *seed train* procesa. Diferencijacija se može zbivati na samim mikronosačima, a potiču ju promjene u komponentama medija, karakteristikama mikronosača ili silama smicanja putem mehanotransdukcije. Stoga mikronosači nude golem potencijal u skaliranju relevantnih populacija matičnih stanica i za pružanje diferenciranih tipova stanica.

#### Dizajn mikronosača

Mikronosači se mogu modificirati na mnogo načina za optimizaciju bioprocesa. Na primjer, topografija mikronosača može se dizajnirati s uglovima za sprječavanje smičnih naprezanja ili s uzorkom za pomoć pri poravnanju stanica i polaritet (Wu i sur., 2018). Relativna gustoća (*Specific gravity*) mikronosača može utjecati na njegovu izvedbu u bioreaktoru, jer gušći i teži mikronosači zahtijevaju više snage za održavanje u suspenzijskoj kulturi, što zauzvrat može utjecati na količinu sile smicanja kojoj su stanice izložene. Obično se izrađuju od materijala poput polisterena, poliakrilamida, stakla ili dekstrana, ali mogu biti izrađeni i od drugih biomaterijala biljnog podrijetla ili materijala koji se mogu enzimatski otopiti ili razgraditi

kemijski, mehanički ili biološki. Metode razgradnje, ako se odaberu, moraju biti brze i kompatibilne s rastom stanica ili parametrima bioprocasa i iako postoji nekoliko materijala i metoda kandidata, potrebna je veća optimizacija. Što se tiče naboja mikronosača, često su obloženi ECM proteinima koji im daju pozitivan naboj ili su kemijski modificirani da budu hidrofilniji kako bi pomogli u pričvršćivanju stanica (Bodiou i sur., 2020). Metode površinske funkcionalizacije kao što je taloženje ionskim snopom ili obrada plazmom također se mogu koristiti za stvaranje povoljnih površinskih svojstava kao što je hidrofilnost.

### **Ostale strategije za ekspanziju stanica**

Među ostale strategije za ekspanziju stanica u mikronosačima ubrajaju se nanomostovi. Nanomostovi su strukture koje omogućuju rast stanica u agregatima kontrolirane veličine, koji se kasnije mogu odvojiti te se stanice mogu prenositi. Prednost ove metode je izbjegavanje područja nekrotičnih zona (odnosno zona bez dotoka kisika i nutrijenata, nakon čega nastupa apoptoza, tj. stanična smrt).

### **Potrebna je optimizacija za kultivirano meso**

Naravno, optimizacija mikronosača za područje kultiviranog mesa je potrebna. Na primjer, malo je vjerojatno da se može razviti univerzalni mikronosač za niz tipova stanica i vrsta, stoga su potrebna nova dizajnerska rješenja. Gustoća nacjepljivanja, koja može utjecati na pričvršćivanje i rast, također će morati biti optimizirana za svaki tip stanice i njezin par mikronosača. Međutim, odluke o korištenju mikronosača morat će biti uravnotežene u odnosu na namjeravani proizvod, što može utjecati na to hoće li se mikronosači privremeno koristiti za proliferaciju, razgraditi se ili otopiti tijekom obrade ili jesu li jestivi i ugrađeni u konačni proizvod (Bodiou i sur., 2020).

#### **2.5.4.1. Hidrogelovi**

Hidrogel je 3D mreža hidrofilnih polimernih lanaca koji mogu lako apsorbirati vodu (do 1000 x više od svoje suhe težine (engl. *dry weight*)). Mogu se konstruirati tako da bubre ili smanjuju bubrenje kao odgovor na različite vanjske podražaje (npr. temperatura, svjetlost, pH, električno polje) i mogu biti podešeni za ugradnju raznih makromolekula (Ahmed, 2015). Zbog hidrofilnog sastava, hidrogelovi prirodno imaju visoku propusnost za kisik i dopuštaju protok molekula topivih u vodi što izvrsno oponaša meka tkiva tijela. Mehanički, strukturalni i kompozicijski podražaji iz vanjske okoline stanica mogu drastično promijeniti funkciju stanica. Hidrogelovi su razvijeni s razlogom da pružaju točno definirane strukturalne komponente za

što bližu rekapitulaciju *in-vivo* staničnih uvjeta te kontrolirano proučavanje staničnih procesa (Caliari i Burdick, 2016).

### **Rekapitulacija mehaničkih svojstava tkiva**

Mehanička svojstva hidrogela često se mjere mikroskopijom atomske sile kako bi se otkrila vrijednost Youngovog modula, koji definira krutost materijala u odnosu na naprezanje i deformaciju. *In vivo*, Youngov modul različitih tipova tkiva je varijabilan i to pomaže odrediti sudbinu stanice putem mehanotransdukcije. Na primjer, masno tkivo i mozak su mekana tkiva (~0,2 – 1,0 kPa), skeletni mišići su srednje mekana (~10 kPa), a kost je tvrdo (~30-45 kPa) tkivo. Stoga, rekapitulacija ovih krutosti unutar nosača može usmjeriti diferencijaciju matičnih stanica. Na primjer, rast mezenhimalnih matičnih stanica na mekim ili tvrdim hidrogelovima može utjecati na njihovu sudbinu u masnoću ili kosti (Guvendiren i Burdick, 2012). Slično, mišićne satelitske stanice mogu se samoobnavljati kada se uzgajaju u supstratu koji odgovara krutosti njihove izvorne niše matičnih stanica. Također, moguće je da se sam hidrogel otopi u mješavini medija i stanica, pomažući pričvršćivanju i širenju stanica. Breemhaar i Post (2019) opisuju upotrebu otopljenog hidrogela napunjenog stanicama za postavljanje stanica u aparat namijenjen diferencijaciji ili strukturiranju stanica. Kod hidrogelskog nosača moguće je podesiti krutost, a to se postiže gušćim umrežavanjem vlakana, dodavanjem ugljikovih nanocijevi, grafena, DNA ili modifikacijom prirodnih ili sintetičkih polimernih materijala s bočnim skupinama koje se mogu foto umrežavati (*photo-crosslinkable side groups*). Međutim, iako hidrogelovi mogu oponašati meka tkiva, ograničeni su u veličini.

### **Vaskularizacija**

Stvaranje debelih i gustih tkiva koja dopuštaju difuziju kisika i transport hranjivih tvari i otpada na analogan način vaskulariziranom tkivu *in vivo* je velik izazov za industriju kultiviranog mesa i aktivno je područje istraživanja. U konvencionalnom tkivnom inženjerstvu, nosač koji se koristi za transplantaciju sadrži pore koje dopuštaju neovaskularizaciju tkiva jednom kad su u tijelu. Međutim, nosač za uzgojeno meso može imati za cilj podržati vitalnost stanica putem perfuzije unutar bioreaktora, umjesto *in situ* vaskularizacije, budući da se s trenutnom tehnologijom tek počinje shvaćati kako stvoriti vaskularizirano tkivo iz matičnih stanica. To znači da bi mreža pora nosača u idealnom slučaju trebala biti međusobno povezana i raspoređena tako da se stanice mogu infiltrirati u nosač i ležati unutar 200 μm od pristupa hranjivim tvarima, budući da je to gornja granica za prijenos mase kisika. U idealnom slučaju, mimika ECM-a trebala bi se dogoditi na udaljenosti *in vivo* strukturnih komponenti ECM-a (tj.

promjera 50 – 500 nm (Barnes i sur., 2007), dok bi poroznost nosača trebala biti na mikrometarskoj skali kako bi se omogućila invazija i migracija stanica. Na kraju, s obzirom na to da tkivo stvoreno za konzumaciju ne mora biti funkcionalno unutar tijela, može biti lakše postići nosač koji je dizajniran da bude manje gusto nacijepljen stanicama. Nakon što se popuni, struktura se može komprimirati na kraju ili dalje strukturirati u konačni proizvod.

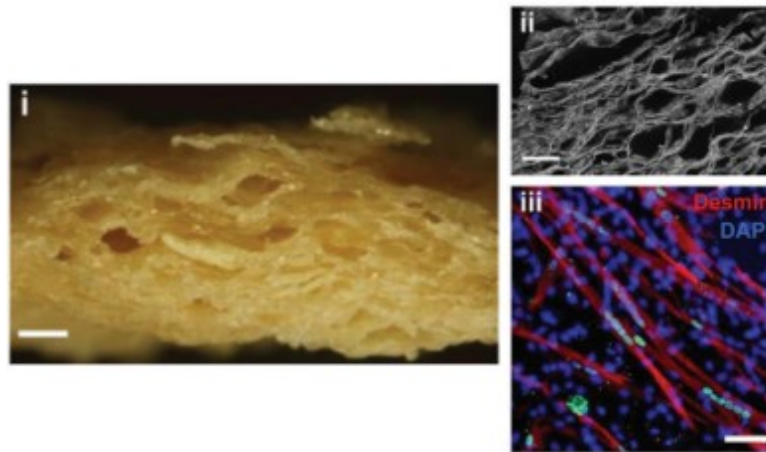
### **Neimunogeni, inertni i biorazgradivi nosači**

U tkivnom inženjerstvu se pažljivo razmatra korištenje neimunogenih, biorazgradivih materijala s biološki inertnim nusproizvodima (jer su namijenjeni za umetanje u tijelo u svrhe regenerativne medicine). Isto tako, nosač koji se biorazgrađuje u inertne nusproizvode bio bi poželjan za kultivirano meso, ne samo kako bi se izbjegla ugradnja nejestivih materijala u konačni proizvod, već i zato što bi se omogućilo stanicama da zamijene nosač hidrogela svojim vlastitim prirodnim ECM-om.

#### **2.5.5. Porozni nosači**

Porozni nosači definiraju se kao nosači sa veličinom pora od 10 do nekoliko stotina mikrona koji imaju spužvastu strukturu koja pruža mehaničku stabilnost potrebnu za stvaranje tkiva i deponiranje ECM-a od strane nacijepljenih stanica. Kod tkivnog inženjerstva ovi nosači rekapituliraju strukturu, mehanička svojstva i kompoziciju perimizijskog vezivnog tkiva, s time da nosač obično ostaje kao integralni dio odraslog tkiva, stoga bi trebao biti jestiv (Bomkamp i sur., 2022). Kod ovog pristupa je zanimljiva mogućnost korištenja jeftinih skalabilnih materijala poput teksturiranog biljnog proteina (TVP od eng. *textured vegetable protein*; Slika 3). U tom pristupu miogeneza je poboljšana, a s obzirom da je TVP izričito prilagodljiv proizvod, mogu se optimizirati parametri poput veličine pora, nutritivne vrijednosti, teksture i elasticiteta (Ben-Arye i sur., 2020).

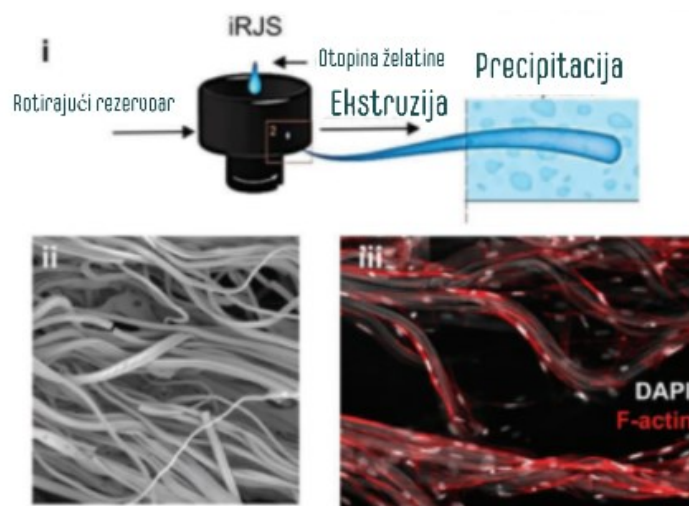




**Slika 3.** i) Porozni teksturirani nosač od sojinog proteina; ii) Detalji pora vidljivi preko konfokalnog mikroskopa iii) Diferencirane goveđe satelitske stanice nakon 4 dana s vidljivim formiranim miotubulama na nosaču (Ben-Arye i sur.,2020; Bomkamp i sur., 2022).

### 2.5.6. Vlknasti nosači

Tehnike pređenja vlakana, poput elektropredenja i pređenja s rotacijskim mlazom koriste se za proizvodnju nanovlakana s različitim korisnim svojstvima za kultivirano meso (slika 4). Prednosti ovog pristupa leže u tome da mogu podržati pričvršćivanje stanica na vlakna i difuziju kisika i nutrijenata (kroz prostore između vlakana) te mogućnost proizvodnje poravnatih vlakana koja mogu pomoći u sazrijevanju mišićnih vlakana (Bomkamp, 2022). Međutim, proizvodnja na velikoj skali koja je ekonomski učinkovita ostaje otvoreno pitanje.



**Slika 4.** Mikrovlaknasta želatina stvorena i) imerzijskim pređenjem s rotacijskim mlazom. ii) Slika želatinoznih vlakana na skenirajućem elektronskom mikroskopu. iii) Kultivirane stanice zečjeg mišićnog tkiva na vlaknastoj želatini s vidljivim pričvršćenim stanicama i poravnanjem

stanica prema obliku nosača (MacQueen i sur., 2019; Bomkamp i sur., 2022)

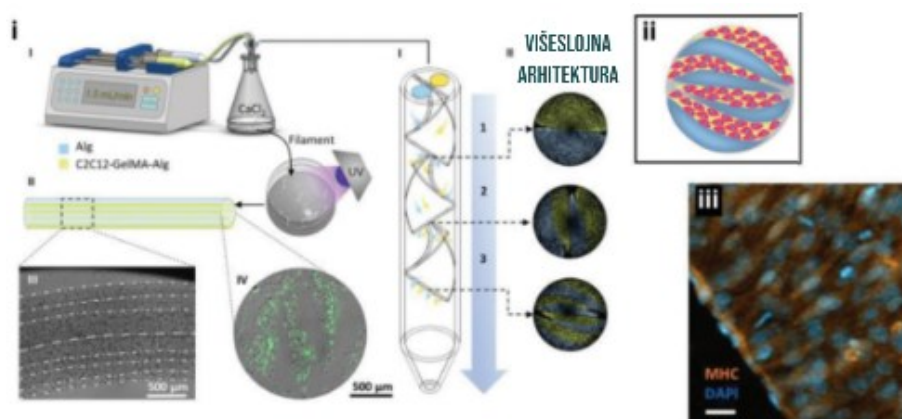
### 2.5.7. 3D bioprintanje

3D bioprintanje je aditivna proizvodna tehnika gdje se same otopine predpolimera ili otopine predpolimera koje sadrže stanice (tj. biotinta) talože na podlogu sloj po sloj pod vodstvom procesa računalno potpomognutog dizajna (CAD). Glavna prednost ovog pristupa je nanošenje materijala u točno definiranom obrascu (Bomkamp i sur., 2020). Jedan od primjera 3D bioprintanja je kontinuirano kaotično bioprintanje (slika 5).

#### Biotinta

U obzir je bitno uzeti da je biotinta ili jestiva ili potpuno biorazgradiva u jestive komponente. Biotinta je sirovina za 3D bioprintanje, sastavljena od stanica u kombinaciji s nekim drugim biološkim materijalom. Postoje dvije glavne vrste materijala biotinte:

1. Na bazi nosača - u biti hidrogel koji se tiska zajedno sa stanicama.
2. Bez nosača - samo velike stanične komponente kao što su niti tkiva ili sferoidi

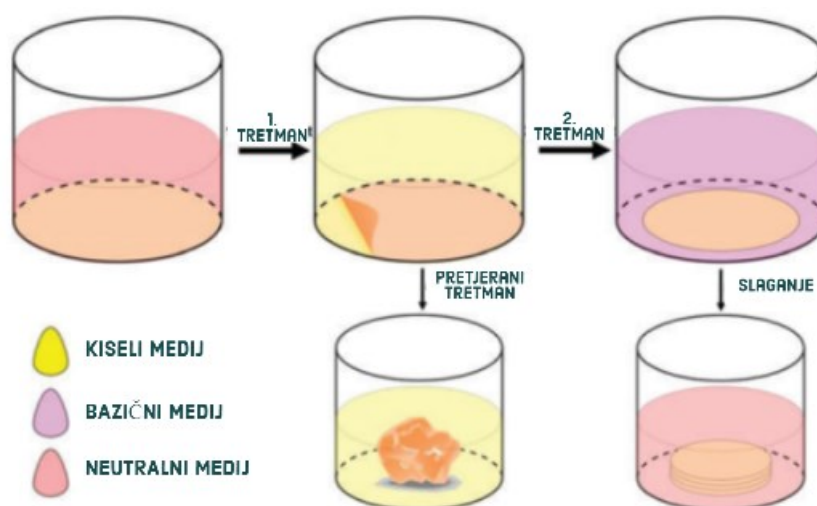


**Slika 5.** i) Shematski prikaz kontinuiranog kaotičnog bioprintanja koekstruzijom dviju tinti iz mlaznice koja sadrži nekoliko elemenata za miješanje koji generiraju ii) višeslojne filamente. iii) Mikroskopski prikaz miotubula (Bomkamp i sur., 2022)

### 2.5.8. Pristupi bez nosača

Iako nosači pružaju brojne prednosti za uzgoj tkiva, pristupi bez nosača također mogu adresirati izazove poput prijenosa kisika i nutrijenata i precizne kontrole 3D geometrije finalnog proizvoda. Kombinacija većeg broja planarnih listova stanica slaganjem jedan na drugog se također može koristiti za formaciju 3D tkiva. U ovom slučaju, ne koriste se ni biotinta ni nosači i stanice se drže zajedno preko vlastitih ekstracelularnih matriksa. Shahin-Shamsabadi i

Selvaganapathy (2020) su koristili promjenu pH vrijednosti kao okidač za delaminaciju stanica i izlučenog ECM-a sa supstrata i brzo samo sastavljanje u sloj stanica (Slika 6). Isti autori su nedavno koristili tu metodu za kultivaciju kombinacije mišjih skeletalnih mišića i adipocita. Proces je skalabilan i relativno brz, ali autori ističu izazove u nedostatku prostora za uzgoj stanica u 2D kulturi te radno intenzivnu prirodu slaganja stanica sloj po sloj. Međutim, te prepreke se mogu riješiti inovativnim dizajnom bioreaktora s automatiziranim slaganjem slojeva stanica. Još jedna prilika u kultivaciji bez nosača leži u spajanju nezavisno izvedenih organoide koja stvaraju funkcionalna tkiva, tzv. “asembloide”. Taj pristup mogao bi se koristiti i kod spajanja mišićnog, adipoznog i vezivnog tkiva za proizvodnju kultiviranog mesa (Bomkamp i sur., 2022).

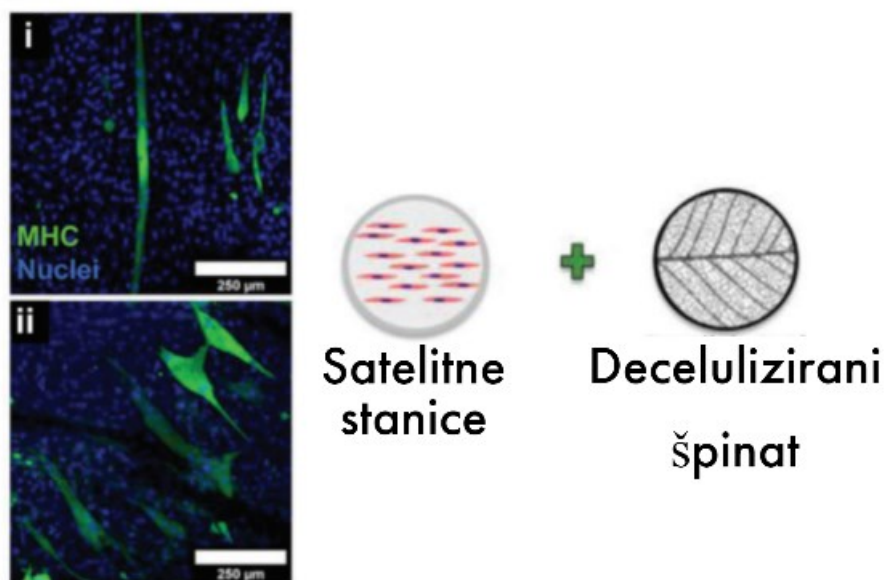


**Slika 6.** Prikaz proizvodnje samo sastavljajućih slojeva stanica. i) Parcijalna diferencijacija stanica za sastavljanje spojenih listova stanica te tretman prvo sa blago kiselim pa blago bazičnim medijem za induciranje delaminacije. ii) Mikroskopski prikaz multinukleiranih miofibrila (Shahin-Shamsabadi i Selvaganapathy,2020 ;Bomkamp i sur. 2022)

### 2.5.9. Decelularizirano tkivo

Decelularizacija je tehnika koja uklanja stanice i nukleinske kiseline iz tkiva uz očuvanje nativnog ECM-a. Decelularizirano tkivo djeluje kao nosač s očuvanom ultrastrukturom i sličnim biofizičkim i biokemijskim svojstvima izvornog tkiva, potencijalno izbjegavajući probleme o kojima se prethodno raspravljalo (npr. poroznost, sastav materijala, krutost itd.). Tehnika se izvodi i na životinjskim i na biljnim i gljivičnim tkivima. Međutim, zbog kompleksnosti povezanih sa decelularizacijom životinjskog tkiva izvjesnije je da će se koristiti

na biljnim, tj. gljivičnim tkivima. Općenito, kod decelularizacije je potrebna ravnoteža između uklanjanja stanica i nukleinskih kiselina i održavanja integriteta nativnog ECM-a. Postoje 3 glavne metode decelularizacije biljnog tkiva: kemijske, fizikalne i enzimatske. Kemijski, biljna tkiva se mogu decelularizirati korištenjem sredstava na bazi deterđenata (SDS, Triton X-100) ili bez deterđenata (zagrijana otopina izbjeljivača) (Bomkamp i sur., 2022). Što se tiče fizikalnih metoda, zamrzavanje i odmrzavanje, elektroporacija, miješanje i sonikacija također se mogu primijeniti kao pomoć u staničnoj lizi. Enzimatske metode obično uključuju tripsin, dispazu, fosfolipaze, egz nukleaze, endonukleaze i druge proteaze. S obzirom na prirodnu vaskulaturu i poroznu strukturu, upotreba decelulariziranih biljaka može olakšati transport kisika i hranjivih tvari. Primjerice, špinat je istraživao kao potencijalni nosač za stanice zbog široke dostupnosti, guste vaskularizacije i široke peteljke (slika 7). Pokazano je da decelularizirani listovi špinata uspješno mogu podržavati rast govedih satelitnih stanica 14 dana (Jones i sur., 2021), perfuziju boja, medija i stanica kroz vaskularizaciju te pričvršćivanje stanica. Osim špinata korišteni su decelularizirani celer, jabuka, peršin, ostale biljke. Dodatno, nedavno je demonstrirana uspješnost decelulariziranih zelenih algi, a trenutno se ispituje fermentirana bakterijska celuloza. Naravno, od iznimne je važnosti imati na umu i utjecaj nosača na organoleptička i nutritivna svojstva (Bomkamp i sur., 2022).



**Slika 7.** Usporedba necijepljenih primarnih govedih stanica nakon 14 dana diferencijacije na: i) supstratu obloženom želatinom; ii) decelulariziranim listovima špinata bojanjem na teški lanac miozina. Postignute su slične razine mišićne diferencijacije (Bomkamp i sur., 2022).

### 3. ZAKLJUČCI

1. Kultivirano meso, tj. općenito polje stanične agrikulture je obećavajuće novo područje s potencijalom rješavanja nekih od najvećih problema održive proizvodnje hrane s kojima se čovječanstvo suočava.
2. Za postizanje komercijalnog uspjeha potrebno je savladati značajne tehnološke prepreke u karakterizaciji i odabiru stanica, dizajnu bioreaktora, formulaciji medija i proizvodnji nosača te sveopćem smanjenju troškova proizvodnje.
3. Nije sigurno da će područje stanične agrikulture uspjeti u svojim nastojanjima za proizvodnjom na industrijskoj skali zbog toga što na neke tehnološke prepreke današnja tehnologija i znanost nema odgovor te će se na putu neizbježno morati događati nova značajna znanstvena otkrića.
4. Kako bi se maksimizirale šanse za uspjehom, potrebno je u područje stanične agrikulture privući iskusne znanstvenike i inovatore u različitim područjima, od softverskog dizajna do molekularnih biologa. Kako bi se to uspjelo, potrebne su velike privatne i javne investicije. Iako zadnjih godina ulaganja značajno rastu, bit će ih potrebno značajno više jer su današnje tek frakcija onih koje dobiva konvencionalna animalna agrikultura.

#### 4. POPIS LITERATURE

Acevedo-Rocha C, Cronenberg L, Mack M, Commichau F, Genee H (2019) Microbial cell factories for the sustainable manufacturing of B vitamins. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **56**, 18-29. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.07.006>.

Ahmed E (2015). Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *J. Adv. Res.*, **6(2)**, 105-121. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.07.006>.

Barnes C, Sell S, Boland E, Simpson D i Bowlin G (2007). Nanofiber technology: Designing the next generation of tissue engineering scaffolds. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **59(14)**, 1413-1433. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.04.022>.

Ben-Arye T, Shandalov Y, Ben-Shaul S, Landau S, Zagury Y, Ianovici I, Lavon N, Levenberg S (2020). Textured soy protein scaffolds enable the generation of three-dimensional bovine skeletal muscle tissue for cell-based meat. *Nat. Food*, **1(4)**, 210-220. . <https://doi.org/10.1038/s43016-020-0046-5>.

Bentzinger C, Wang Y, von Maltzahn J, Soleimani V, Yin H, Rudnicki M (2013). Fibronectin Regulates Wnt7a Signaling and Satellite Cell Expansion. *Cell Stem Cell*, **12(1)**, 75-87. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.09.015>.

Bodiou V, Moutsatsou P, Post M (2020). Microcarriers for Upscaling Cultured Meat Production. *Front. nutr.*, **7**. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.00010>.

Bogliotti Y, Wu J, Vilarino M, Okamura D, Soto D, Zhong C, Sakurai M, Sampaio R, Suzuki K, Izpisua Belmonte J i Ross P (2018). Efficient derivation of stable primed pluripotent embryonic stem cells from bovine blastocysts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **115(9)**, 2090-2095. <https://doi.org/10.1073/pnas.1716161115>.

Bomkamp C, Skaalure S, Fernando G, Ben-Arye T, Swartz E i Specht E (2022). Scaffolding Biomaterials for 3D Cultivated Meat: Prospects and Challenges. *Adv. Sci.*, **9(3)**, 2102908. <https://doi.org/10.1002/advs.202102908>.

Breemhaar J i Post M (2019). *Apparatus and process for production of tissue from cells*. Patent US20190338232A1.

CDC (2022). *Zoonotic Diseases*. CDC - Centers for Disease Control and Prevention, <https://www.cdc.gov/onehealth/basics/zoonotic-diseases.html>. Pristupljeno 1. kolovoza 2022.

Choi K, Yoon J, Kim M, Lee H, Jeong J, Ryu M, Jo C, Lee C (2020). Muscle stem cell isolation and in vitro culture for meat production: A methodological review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, **20(1)**, 429-457. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12661>.

Clark M, Domingo N, Colgan K, Thakrar S, Tilman D, Lynch J, Azevedo I, Hill J (2020). Global food system emissions could preclude achieving the 1.5° and 2°C climate change targets. *Science*, **370(6517)**, 705-708. <https://doi.org/10.1126/science.aba7357>.

Cohen M, Ignaszewski E, Murray S, O'Donnell M, Swartz E, Voss S, Weston Z (2022). *Cultivated Meat State of the Industry Report*. The Good Food Institute. <https://gfi.org/resource/cultivated-meat-eggs-and-dairy-state-of-the-industry-report/>.  
Pristupljeno 2. kolovoza 2022.

Consumer Reports (2022). *97% of the breasts we tested harbored bacteria that could make you sick. Learn how to protect yourself*. <https://www.consumerreports.org/cro/magazine/2014/02/the-high-cost-of-cheap-chicken/index.htm>. Pristupljeno 3. kolovoza 2022.

Ding S, Swennen G, Messmer T, Gagliardi M, Molin D, Li C i sur. (2018). Maintaining bovine satellite cells stemness through p38 pathway *Sci. Rep.*, **8(1)**. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28746-7>.

Ding S, Wang F, Liu Y, Li S, Zhou G, Hu P (2017). Characterization and isolation of highly purified porcine satellite cells. *Cell Death Discov.*, **3(1)**. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2017.3>.

Djusalov M, Knežić T, Podunavac I, Živojević K, Radonic V, Knežević N i sur. (2021). Cultivating Multidisciplinary: Manufacturing and Sensing Challenges in Cultured Meat Production. *Biology*, **10(3)**, 204. <https://doi.org/10.3390/biology10030204>.

Freshney R (2016). *Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*, 7.izd. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey

Genovese N, Domeier T, Telugu B, Roberts R (2017). Enhanced Development of Skeletal Myotubes from Porcine Induced Pluripotent Stem Cells. *Sci. Rep.*, **7(1)**. <https://doi.org/10.1038/srep41833>.

Guvendiren M i Burdick J (2012). Stiffening hydrogels to probe short- and long-term cellular responses to dynamic mechanics. *Nat. Commun.*, **3(1)**. <https://doi.org/10.1038/ncomms1792>.

Haraguchi Y i Shimizu T (2021). Microalgal culture in animal cell waste medium for sustainable 'cultured food' production. *Arch. Microbiol.*, **203(9)**, 5525-5532. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02509-x>.

Hayek M, Harwatt H, Ripple W, Mueller N (2020). The carbon opportunity cost of animal-sourced food production on land. *Nat. Sustain.*, **4(1)**, 21-24. <https://doi.org/10.1038/s41893-020-00603-4>.

Humbird D (2021). Scale-up economics for cultured meat. *Biotechnol. Bioeng.*, **118(8)**, 3239-3250. <https://doi.org/10.1002/bit.27848>

Kolkmann A, Post M, Rutjens M, van Essen A, Moutsatsou P (2020). Serum-free media for the growth of primary bovine myoblasts. *Cytotechnology*, **72(1)**, 111-120. <https://doi.org/10.1007/s10616-019-00361-y>.

Kuo H, Gao X, DeKeyser J, Fetterman K, Pinheiro E, Weddle C i sur. (2020). Negligible-Cost and Weekend-Free Chemically Defined Human iPSC Culture. *Stem Cell Rep.*, **14(2)**, 256-270. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2019.12.007>.

Landers T, Cohen B, Wittum T i Larson E (2012). A Review of Antibiotic Use in Food Animals: Perspective, Policy, and Potential. *Public Health Rep.*, **127(1)**, 4-22. <https://doi.org/10.1177/003335491212700103>.

MacQueen L, Alver C, Chantre C, Ahn S, Cera L, Gonzalez G i sur. (2019). Muscle tissue engineering in fibrous gelatin: implications for meat analogs. *NPJ Sci. Food*, **3(1)**. <https://doi.org/10.1038/s41538-019-0054-8>

FAO (2011). *World Livestock 2011 – Livestock in food security*. FAO – Food and Agriculture Organization of The United Nations. FAO, Rim.

Messmer T, Klevernic I, Furquim C, Ovchinnikova E, Dogan A, Cruz H i sur. (2022). A serum-free media formulation for cultured meat production supports bovine satellite cell differentiation in the absence of serum starvation. *Nat. Food***3(1)**, 74-85. <https://doi.org/10.1038/s43016-021-00419-1>

O'Neill E, Cosenza Z, Baar K i Block D (2020). Considerations for the development of cost-effective cell culture media for cultivated meat production. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, **20(1)**, 686-709. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12678>.

Post M i van der Weele C (2014). Principles of Tissue Engineering for Food. *Princ. of Tissue Eng.*, 1647-1662. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398358-9.00078-1>.

Post M, Levenberg S, Kaplan D, Genovese N, Fu J, Bryant C (2020). Scientific, sustainability and regulatory challenges of cultured meat. *Nat. Food*, **1(7)**, 403-415. <https://doi.org/10.1038/s43016-020-0112-z>.



Reiss J, Robertson S i Suzuki M (2021). Cell Sources for Cultivated Meat: Applications and Considerations throughout the Production Workflow. *Int. J. Mol. Sci.*, **22(14)**, 7513. <https://doi.org/10.3390/ijms22147513>.

Risner D, Li F, Fell J, Pace S, Siegel J, Tagkopoulos I i Spang E (2020). Preliminary Techno-Economic Assessment of Animal Cell-Based Meat. *Foods*, **10(1)**, 3. <https://doi.org/10.3390/foods10010003>.

Salazar A, Keusgen M i von Hagen J (2016). Amino acids in the cultivation of mammalian cells. *Amino Acids*, **48(5)**, 1161-1171. <https://doi.org/10.1007/s00726-016-2181-8>.

Schnitzler A, Verma A, Kehoe D, Jing D, Murrell J, Der K i sur. (2016). Bioprocessing of human mesenchymal stem/stromal cells for therapeutic use: Current technologies and challenges. *Biochem. Eng. J.*, **108**, 3-13. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.08.014>.

Shahin-Shamsabadi A i Selvaganapathy P (2020). Engineering Murine Adipocytes and Skeletal Muscle Cells in Meat-like Constructs Using Self-Assembled Layer-by-Layer Biofabrication: A Platform for Development of Cultivated Meat. *Cells Tissues Organs*, **211(3)**, 304-312. <https://doi.org/10.1159/000511764>.

Shapiro P (2018). *Clean meat*, 1.izd., Simon & Schuster, Manhattan, New York City.

Sinke P i Odegard I (2021). *LCA of cultivated meat*. CE Delft, 2021.

Song X, Hansen M, Stehman S, Potapov P, Tyukavina A, Vermote E i sur. (2018). Global land change from 1982 to 2016. *Nature*, **560(7720)**, 639-643. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0411-9>.

Specht L (2020). *An analysis of culture medium costs and production volumes for cultivated meat*. The Good Food Institute, 2020.

Steinfeld H (2006). *Livestock's long shadow*. FAO, Rim.

Sun Z, Guo S, Fässler R (2016). Integrin-mediated mechanotransduction. *J. Cell Biol.*, **215(4)**, 445-456. <https://doi.org/10.1083/jcb.201609037>.

Takahashi K i Yamanaka S (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, **126(4)**, 663-676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>.

van der Valk J (2018). Fetal bovine serum (FBS): Past – present – future. *ALTEX*, 99-118. <https://doi.org/10.14573/altex.1705101>.

Verbruggen S, Luining D, van Essen A i Post M (2018). Bovine myoblast cell production in a microcarriers-based system. *Cytotechnology*, **70(2)**, 503-512. <https://doi.org/10.1007/s10616-017-0101-8>.

Wang Y, Tibbetts S, McGinn P (2021). Microalgae as Sources of High-Quality Protein for Human Food and Protein Supplements. *Foods*, **10(12)**, 3002. <https://doi.org/10.3390/foods10123002>.

Wosczyzna M i Rando T (2018). A Muscle Stem Cell Support Group: Coordinated Cellular Responses in Muscle Regeneration. *Dev. Cell*, **46(2)**, 135-143. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.06.018>.

Wu C, Stoecklein D, Kommajosula A, Lin J, Owsley K, Ganapathysubramanian B i sur. (2018). Shaped 3D microcarriers for adherent cell culture and analysis. *Microsyst. Nanoeng*, **4(1)**. <https://doi.org/10.1038/s41378-018-0020-7>.

Yao T i Asayama Y (2017). Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reprod. Med. Biol.*, **16(2)**, 99-117. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12024>.

## Izjava o izvornosti

Ja Tin Rudnički izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

---

Vlastoručni potpis