

SOLUMAATALOUDEN KÄYTTÖ LIHANTUOTANNOSSA

TkK-tutkielma
Turun yliopisto
Bioteknologian laitos
Biotekniikka
04.2024
Irene Parvinen

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys
on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

Tiivistelmä

TURUN YLIOPISTO

Bioteknologian laitos

IRENE PARVINEN: Solumaatalouden käyttö lihantuotannossa

Tutkielma, 17 s, 1 liitesivu

Biotekniikka

11.2023

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkistettu Turnitin Originality Check -järjestelmällä.

Globaali lihan kulutus on noussut viime vuosikymmeninä dramaattisesti, ja sen on ennustettu kasvavan vielä 73% vuoteen 2050 mennessä. Tämä perinteiseen lihantuotantoon kohdistuva kasvava paine on ajanut tutkijoita etsimään vaihtoehtoisia kestävämpiä lihantuotannon tapoja.

Soluliha viitataan eläinsoluista *in vitro* tuotettuun lihaan. Käytetyin solulähde solulihan tuotannolle on multipotentit eli monikykyiset aikuisen kantasolut, joita saadaan suoraan eläimen kudoksesta. Niiden jakautumiskyky ja *in vitro* -kasvatus on kuitenkin rajoittunutta ja uusia kestävämpiä solulinjoja tarvitaan kasvatuksen tehostamiseksi. Lihassolujen kasvatuksessa ongelmaksi nousee myös solujen ankkuroitumistarve erikoistumista varten. Useita eri biologisia rakenteita on kehitteillä tähän käyttötärpeeseen, mutta mikrokantajat ovat ainoita, jotka toistaiseksi vaikuttavat olevan käytössä laajasti. Mikrokantajien avulla voidaan kuitenkin tuottaa vain solumassaa. Kokonaisten lihaskudosten muodostamiseen ole löydetty vielä sopivia tekniikoita.

Jotta solulihan tuotannosta tulisi kannattavaa, on tuotannon hintaa saatava alas. Hintatason alentamiseksi on pyrittävä eroon kalliista eläinlakeista ja kehitettävä automatisoituja ja standardisoituja prosesseja. Lisäksi tuotteen on saatava kuluttajan kannalta haluttavat aistittavat ominaisuudet.

Solulihan tuotanto on lupaava prosessi, joka kehityksen myötä voisi vähentää tarvetta perinteisen lihantuotannon kasvulle. Tuotettua solumassaa voidaan käyttää muun muassa prosessoiduissa lihatuotteissa. Solulihan käyttöönotto vaatisi vielä monissa maissa ja koko Euroopassa lainsäädännöllisiä ja asetuksellisia muutoksia.

Asiasanat: soluliha, solumaatalous, bioreaktori, mikrokantaja, solulevy, kantasolu, kasvatusliuos

Sisällys

1	Johdanto	2
2	Tuottosolujen valinta.....	3
2.1	Multipotentit aikuisen kantasolut.....	4
2.2	Pluripotentit kantasolut.....	5
3	Biologiset tukirakenteet.....	6
3.1	Mikrokantajat.....	6
3.2	Solulevyt	8
4	Tuotanto.....	9
4.1	Bioreaktorit.....	9
4.2	Kasvatusliuos	11
4.3	Kasvuolosuhteet.....	13
5	Solulihan ominaisuudet	15
6	Loppuyhteenveto.....	16
7	Kirjallisuus	17

1 Johdanto

Globaali lihan kulutus on noussut viime vuosikymmeninä dramaattisesti, ja sen on ennustettu kasvavan vielä 73% vuoteen 2050 mennessä. Yhden naudanlihakilon tuottamiseen arvioidaan kuluvan 15 000 l vettä ja 40 m² maata ja sen arvioidaan tuottavan 300 kg CO₂. Lisäksi 30 % kaikesta maapallolla tuotetusta sadosta syötetään eläimille rehuna. (Melzener ja muut 2021.) Lihan kulutus on yhdistetty myös useiden sairauksien puhkeamiseen. Suuret paineet perinteiselle lihantuotannolle on ajanut tieteellisen yhteisön tutkimaan vaihtoehtoisia tuotantomuotoja lihalle. Viime vuosina mediahuomioon noussut soluliha on uusi kehittyvä teknologia, jolla on arvioitu olevan mahdollisuuksia ratkoa suuria ympäristöllisiä, eettisiä ja terveydellisiäkin ongelmia.

Solulihalla viitataan in vitro tuotannolla eläinsoluista tuotettuun lihaan (Reiss ja muut 2021). Solulihan tuotanto voidaan yleisesti jakaa neljään vaiheeseen. Ensimmäinen vaihe pitää sisällään kasvatussolujen eristämisen eläimestä. Toisessa vaiheessa solukasvatuksen skaalaa suurennetaan haluttuun mittakaavaan. Kolmas vaihe pitää sisällään solujen erilaistumisen ja mahdollisen kudoksen muodostumisen. Neljännessä vaiheessa solut käsitellään lopulliseksi tuotteeksi. (Pajčin ja muut 2022.)

Singapore on solulihaan liittyvän tutkimuksen ja tuotannon johtavia maita sallivan lainsäädäntönsä vuoksi. Euroopassa lainsäädäntö ei salli vielä solulihan tuotantoa sen puutteellisen tutkimuksen vuoksi. Singapore on ensimmäisenä maana antanut myös myyntiluvan solulihalle. Alalla toimii jo useita yrityksiä, joista Eat Just on ensimmäinen yritys, joka on tuonut markkinoille myös ravintolan, joka tarjoaa solulihasta tuotettuja annoksia.

Toistaiseksi tutkimus solulihasta on vielä alkukannoilla. Tutkimusmittakaavassa solulihaa on tuotettu laboratorioissa eri olosuhteissa, mutta pääpaino teollisuuskaavan tuotannossa on yrityksillä, mikä rajoittaa saatavilla olevan tiedon määrää. Solulihan tuotannolle ei myöskään ole laadittu standardisoituja tuotantoprosesseja, joten tieto perustuu lähinnä solulihan tuotannon parissa tehtyihin tutkimuksiin. Tässä tutkielmassa käsitellään solulihan tuotantoprosessin vaiheita, tuotannon haasteita, sekä lupaavimpia käytäntöjä teoria pohjalta.

2 Tuottosolujen valinta

Syömämme liha on luurankolihasta. Luurankolihasen muodostavat myosyytit eli lihassolut, adiposyytit eli rasvasolut, fibroblastit eli sidekudosta muodostavat solut, kondrosyytit eli rustosolut ja hematopoeettiset solut eli eri verisoluja tuottavat solut. Oikeaa koostumusta lihalle ei voida saavuttaa ilman erityyppisiä soluja. (Reiss ja muut 2021.) Tätä lihan kolmiulotteista rakennetta on haastavaa saavuttaa solutyypin erilaisten kasvuvaatimusten vuoksi (Pajčin ja muut 2022).

Solulihan tuottamiseen käytetään usein lihasten progenitorisoluja. Progenitorisolut voivat erottua vain rajatuksi kohdesolutyypiksi, kuten endoteeliseksi ja sileäksi lihaskudokseksi. Niillä on rajallinen uusiutumiskyky toisin kuin pluripotentilla kantasoluilla, mikä tekee niistä multipotentteja soluja. Kasvatettavien solujen tulee pystyä lisääntymään suurissa määrin sekä kyetä erikoistumaan kypsiksi solutyypeiksi, joista liha koostuu. Tämä saadaan kuitenkin teoriassa parhaiten toteutettua pluripotenttien kantasolujen avulla niiden erinomaisen jakautumis- ja erilaistumiskyvyn vuoksi. (Reiss ja muut 2021.)

Kasvatusta aloittaessa on harkittava, halutaanko tuottosoluina käyttää multipotentteja vai pluripotentteja soluja. Multipotentteja soluja saadaan biopsianäytteestä, joka on ensisijainen solulähde. Näytteet otetaan halutun lajin ja tarkoin valitun yksilön tietyistä kudoksesta. (Reiss ja muut 2021.) Valittavien solujen ominaisuuksiin vaikuttaa isäntäeläimen ikä, sukupuoli ja rotu. Rotujen välisten satelliittisolujen lisääntymis- ja jakautumiskyvyssä on huomattu pieniä eroavaisuuksia, ja niihin liittyviä tutkimuksia on käynnissä. (Melzener ja muut 2021.)

Toinen vaihtoehto on käyttää pluripotentteja soluja. Ne voivat olla indusoituja pluripotentteja kantasoluja (engl. induced pluripotent stem cells, iPSC), alkion kantasoluja (engl. embryonic stem cells, ESC) tai aikuisen kantasoluja. Usein tuotantoa varten halutaan homogeeninen solupopulaatio. Tämä voidaan saavuttaa testaamalla tiettyjä solutyypille tyypillisiä solumarkkereita tai transkriptiofaktoreita, joiden pohjalta solujen erottelu toisistaan tapahtuu. (Reiss ja muut 2021.)

Solulähteen valinta vaikuttaa merkittävästi koko prosessin tehokkuuteen, ja tästä syystä on tärkeää identifioida hyvän solulähteen ominaispiirteet. Kaksi tärkeintä ominaispiirrettä ovat hyvä solujen saanto kudossmassaa kohti ja näiden solujen pitkäikäisyys. Pitkäikäisyydellä tarkoitetaan, kuinka monta eri solupopulaatiota solut voivat käydä läpi samalla säilyttäen niiden erilaistumiskyvyn lopputuotteeksi. Nämä ominaisuudet määrittävät, kuinka paljon lopputuotetta saadaan tuotettua alkuperäisestä solumäärästä. (Melzener ja muut 2021.) Kudoksilla on myös muita ominaisuuksia, jotka vaikuttavat

solujen ominaisuuksiin. Esimerkiksi rasvakudoksesta saaduilla kantasoluilla on taipumus muuttua pahanlaatuisiksi pitkäaikaisissa kasvatuksissa (Pajčín ja muut 2022). Progenitorisolujen lähteestä riippumatta, tarvitsevat lihasta muodostavat progenitorisolut myöhemmin ankkurin erilaistumiseen, sekä lisääntymiseen (Reiss ja muut 2021).

2.1 Multipotentit aikuisen kantasolut

Multipotentit aikuisen kantasolut ovat tällä hetkellä eniten käytetty solulähde. Ne ovat erikoistumattomia progenitorisoluja, jotka sijaitsevat tietyssä elimessä tai kudoksessa. Nämä solut ovat multipotentteja, eli ne voivat erilaistua vain sijaitsemassaan kudoksessa olevaan rajattuun määrään solutyyppejä. Koska soluja saadaan suoraan kudoksenäytteestä, on solujen saaminen helppoa ja halpaa. Multipotenttien aikuisten kantasolujen lisääntymiskyky ja ylläpito on kuitenkin hyvin rajallista in vitro. (Reiss ja muut 2021.)

Ensisijaisten solulähteiden erikoistuneet luustolihasolut voidaan erottaa progenitorisoluista, jotka otetaan tuotantokäyttöön. Aikuisen kantasoluista löytyy kolmea eri progenitori-/ kantasolutyyppeä, jotka soveltuvat solulihan tuotantoon: lihassatelliittisoluja (engl. satellite cells, SCs), mesenkymaalisia kantasoluja/strooman soluja (engl. mesenchymal stem cells, MSCs) ja fibro / adipogeeniset esiasteet (engl. fibro/adipogenic progenitors, FAPs). (Reiss ja muut 2021.) Näitä kaikkia solutyyppejä yhdistämällä saadaan aikaiseksi kaikki solutyypit, joita lihasta löytyy (Pajčín ja muut 2022).

Lihassatelliittisoluilla on hyvä erilaistumiskyky myosyyteiksi, jotka voivat pakkaantua lihassäikeiksi. Ne ovat yleisimpiä aikuisen kantasoluja kudoksessa, ja niiden eristys sekä in vitro -käsittely ovat hyvin tunnettuja prosesseja. (Reiss ja muut 2021.) Satelliittisolut kykenevät jakautumaan uusiksi satelliittisoluiksi tai erilaistumaan. Rajoittunutta jakautumiskykyä on pyritty parantamaan pitämällä soluja ei-erikoistuneessa lisääntymistilassa inhiboimalla solujen in vitro p38-mitogeeniaktivoitu proteiinikinaasi signalointireitti (engl. mitogen-activated protein kinase, MAPK). (Pajčín ja muut 2022.) Myoblastit eli myosyyttien esiasteet ovat kiinnittyviä ja ankkuroinnista riippuvaisia soluja. Ne tarvitsevat biologisia rakenteita lisääntymiseen ja erilaistumiseen. (Reiss ja muut 2021.)

MSC:tä löytyy yleisimmin luuytimeistä mutta jonkin verran myös luurankolihasista. Niillä on hyvä erilaistumiskyky adiposyyteiksi, kondrosyyteiksi ja fibroblasteiksi. (Reiss ja muut 2021.) MSC:t säilyttävät hyvin niin sanotun lepotilansa ja täten myös erilaistumiskykynsä (Pajčín ja muut 2022). Fibro/adipogeeniset esiasteet lasketaan usein erilliseksi mesenkymaaliseksi ryhmäksi. Niitä sijaitsee luurankolihasen niin sanotussa

välitilassa. Niillä on hyvä erilaistumiskyky fibroblasteiksi ja adiposyyteiksi, jotka muodostavat lihassa olevan sidekudos- ja rasvakudospohjat. (Reiss ja muut 2021.)

2.2 Pluripotentit kantasolut

Pluripotentteilla kantasoluilla on todella hyvät lisääntymis- ja erilaistumisominaisuudet (Reiss ja muut 2021). Niiden jakautumiskyky on rajaton. Toisaalta tytärsolujen muodostaessa hiljalleen erikoistuneempia multipotenttisiä kantasoluja, niiden pluripotencia heikkenee nopeasti ja paljon. (Pajčin ja muut 2022) Tätä spontaania erilaistumista tapahtuu paljon kasvatuksissa, joissa solut kasvavat aggregaatteina. Aggregaattien hajauttaminen yksittäisiksi soluiksi ja niiden käsittely Rho-kinaasilla yksittäisten solujen kuoleman välttämiseksi estää tätä erilaistumista. Rho-kinaasin vaikutusta elintarvikkeisiin ei ole tutkittu vielä tarpeeksi kattavasti, jotta sitä voitaisiin hyödyntää lihantuotantoprosesseissa. (Ge ja muut 2023.) Lisäksi pluripotenttien kantasolujen saanti on kallista ja ylläpito hankalaa. Ne vaativat myös enemmän aikaa ja resursseja erilaistumiseen, sillä ne ovat kauempana erikoistuneemmasta muodosta kuin multipotentit aikuisen kantasolut. (Reiss ja muut 2021.)

Jotta tuotannossa pystytään käyttämään pluripotentteja alkion kantasoluja, on mesodermi, joka vastaa muun muassa lihasten tuotosta, erotettava muista alkiokerroksista. Alkiorakkulan lyhyen kehitysikkunan takia soluja on hyvin vaikea saada, ja niiden saaminen herättää monia eettisiä kysymyksiä. iPSC:t ovat monikykyisiä soluja, jotka voivat erilaistua miksi tahansa muuksi soluksi kuin istukan soluksi. (Reiss ja muut 2021.) Ne tuotetaan ESC-kantasoluista tai aikuisen kantasoluista, joihin tehdään transkriptionaalisia muutoksia tai ne käänteisohjelmoidaan alkion kantasolujen kaltaiseen pluripotentialaan. iPSC:t tuottavat silti tuntemattomista syistä vain soluja, joiden erilaistumis- ja lisääntymisominaisuudet ovat heikkoja. Näitä ominaisuuksia on pyritty parantamaan muun muassa kasvutekijöiden ja pienmolekyylien spesifisellä lisäämisellä kasvatusliuokseen sekä käyttämällä transkriptiotekijöitä. (Pajčin ja muut 2022.)

3 Biologiset tukirakenteet

Biologiset rakenteet tukevat solujen erilaistumista ja kudosten muodostumista kasvatuksessa. Nämä voivat määrittää tuotetun solulihan muodon ja ”solujärjestyksen”, jotka vaikuttavan muun muassa tuotteen koostumukseen. Nämä tukirakenteet ovat biologisesti yhteensopivia materiaaleja, jotka tukevat solujen sitoutumista niihin. Tämä tarkoittaa mekaanisen tuen lisäksi huokoisuutta, joka edistää ravinteiden pääsyä soluun diffuusion avulla. Biologiset rakenteet mahdollistavat kanta-/progenitorisolujen erilaistumisen ankkuroitumisen avulla ja vaikuttavat lopullisen tuotteen muotoon ja solujärjestykseen. Koska lopputuote on tehty syötäväksi, on tukirakenteiden oltava biohajoavia, syötäviä tai irrotettavia. (Reiss ja muut 2021.) Nykyisin tuotettu liha on lähinnä solumassa, eikä sisällä merkittäviä biorakenteita, sillä spesifisesti solulihan tuotannolle kehitettyjä rakenteita on vielä hyvin vähän (Reiss ja muut 2021; Pajčin ja muut 2022).

Tukirakenteita voidaan valmistaa joko kudosa- / solukomponenteista tai niitä jäljittelevistä komponenteista (Reiss ja muut 2021). Yleisimmin rakenteisiin käytetään vielä eläinperäisiä materiaaleja, kuten gelatiinia ja kollageenia. Niiden huonon itsereplikoitumiskyvyn vuoksi, on näitä luonnollisia polymeerejä hankittava eläimistä. Tämä tekee niistä kalliita, ei kestävänsä kehityksen mukaisia ja ne aiheuttavat suuren ympäristövaikutuksen. (Pajčin ja muut 2022.) Eläinperäisille lähteille on tutkittu myös kasviperäisiä vaihtoehtoja. Maissiproteiini tseiniin on todettu olevan tähän lupaava vaihtoehto (Qu ja muut 2008).

3.1 Mikrokantajat

Mikrokantajat ovat mikrokokoisia pallomaisia helmiä, joita voidaan tehdä luonnollisista tai biomateriaaleista (Reiss ja muut 2021). Käytettävien mikrokantajien koko riippuu kasvatettavista soluista. Alkion kantasoluille sopivat 50–100 µm:n ja mesenkymaalisille kantasoluille 100–300 µm:n kokoluokan mikrokantajat. (Yang ja muut 2022.) Mikrokantajia on aiemmin käytetty lääketieteen alalla, minkä vuoksi niitä on lähdetty soveltamaan myös solulihan tuotantoon (Ge ja muut 2023). Mikrokantajien etuna verrattuna muihin biologisiin rakenteisiin on tuotannon yksinkertaisuus suurissakin määrissä ja helppo integrointi eri reaktorijärjestelmiin (Pajčin ja muut 2022). Mikrokantajia käytetään suspensioviljelmissä, joissa solut leijuvat vapaasti kasvatusliuoksessa kiinnittyneinä mikrokantajiin. Mikrokantajien pinta-ala-tilavuus suhde auttaa huomattavasti suurempien solumäärien saavuttamisessa, sillä ne mahdollistavat suurien solutiheyksien kiinnittymisen niihin. Mikrokantajien avulla voidaan pyrkiä parantamaan lihan ominaisuuksia, kuten makua, väriä ja koostumusta

(Reiss ja muut 2021). Tällä kasvatustavalla muodostuu lähinnä solumassaa, jolla ei ole luustolihaksen oikeanlaista rakennetta. Siksi se sopii lähinnä prosessoituihin lihatuotteisiin (Datar ja Betti 2010).

Mikrokantajia voidaan valmistaa muun muassa polyglykolihaposta tai polyetyleeniglykolista, jotka ovat syötäviä inerttejä materiaaleja, mikä tarkoittaa että ne voidaan jättää lopulliseen tuotteeseen. Käytettyjä luonnollisia polymeerejä, jotka voidaan jättää tuotteeseen, on valmistettu myös kasvi-, eläin- ja leväperäisistä lähteistä. Parafiinista, maissiproteiinista, kollageenista, gelatiinista tai esimerkiksi pektiinistä valmistetuissa mikrokantajissa on etuna näiden materiaalien helppo saatavuus sekä biohajoavuus. Syötäviä mikrokantajia solulihantuotantoon valmistavia yrityksiä on vielä harvoja, mutta niihin lukeutuvat muun muassa Matrix Meats ja Tantt Laboratory. Ei-syötävien, kuten polylaktidi-polyglykolidi-pohjaisten, mikrokantajien etuna on helpompi ruokaturvallisuussäädösten toteuttaminen, sillä mikrokantaja ei jää lopulliseen tuotteeseen. Tämä silti lisää ylimääräisen hankalan prosessoinnin, joka voi pienentää lihan lopullista tuotantomäärää. Käytettävän mikrokantajan materiaali tulisi päättää solun kyvyn mukaan sitoutua kantajan pintaan, sekä niiden välille syntyvien fysikaaliskemiallisten sidosten laadun ja vahvuuden perusteella. (Pajčin ja muut 2022.)

Mikrokantajien käytössä ongelmana on solujen irtoaminen ja solukuolemat, jotka pienentävät käytettävissä olevien solujen ja kudosten tuottoa (Reiss ja muut 2021). Mikäli mikrokantajan pintaan kiinnittyy liian suuri määrä soluja lisääntymään, voi keskelle jääneiden solujen ravinneaineiden ja hapen saanti estyä, jolloin ne lopulta kuolevat. Mikäli solut eivät kykene kiinnittymään mikrokantajaan tehokkaasti, ne voivat irrota siitä. Lihasta muodostavat solut eivät kykene selviytymään kasvatuksessa irrallisina.

Yang tutkimusryhmineen on tutkinut, miten solujen irtoamista voitaisiin vähentää. He tutkivat mikrokantajia käyttävään myoblastikasvatukseen vaikuttavia tekijöitä. He huomasivat mikrokantajien UV-käsittelyn parantavan solujen kykyä sitoutua mikrokantajiin, mutta samaan aikaan solujen vaurioituvan. Kollageenin käytön mikrokantajissa huomattiin edistävän solujen sitoutumista ja vähentävän UV-valon aiheuttamia vahinkoja. Näiden kahden yhdistäminen todettiin hyväksi vaihtoehdoksi solujen sitoutumisen ja lisääntymiskyvyn parantamiseksi. Lisäksi kollageenin konsentraatio vaikutti muodostuneiden soluryhmittymien määrään. Konsentraation kasvaessa myös soluryhmittymien määrä kasvoi, indikoiden kollageenin kykyä edistää myogeneesiä eli myoblastien erilaistumista lihaskudokseksi. (Yang ja muut 2022.)

Mikrokantajille on kehitetty myös muita harkittavia vaihtoehtoja kuten organoideja, sferoideja ja lämpöherkkiä mikrokantajia (Pajčín ja muut 2022). Biologisia rakenteita on tehty myös 3D-bioprinttauksen avulla. Siinä voidaan käyttää niin sanottua biomustetta, mutta tekniikka vaatii paljon kehitystä (Reiss ja muut 2021).

3.2 Solulevyt

Solulevytekniikassa lihaskudoksen muodostuksessa ei ole tarvetta ulkoisille rakenteille. Tässä solulevyjä tuotetaan monesti käyttämällä lämpötilaherkkiä kasvatusastioita, joiden pintaan on sidottu kovalenttisesti lämpötilaan reagoivaa polymeeriä poly(N-isopropyyli akryyliamidia) eli PNIPAM:ia. Tämä tekee astian pinnasta hydrofiilisen alle 32 °C:ssa ja hydrofobisen 37 °C:ssa. Tämän ominaisuuden ansiosta solut pystyvät toistensa lisäksi sitoutumaan astian pintaan 37 °C:ssa ja irtoamaan astian pinnasta alle 32 °C:ssa, pysyen samalla kiinni toisissaan luoden solulevyn. Solulevyistä saadaan useiden millimetrien, jopa senttien, paksuista solutiheää kudosta kasaamalla solulevyjä päällekkäin ja kiinnittämällä niitä toisiinsa. (Tanaka ja muut 2022.)

Levyjen kasaaminen paksummaksi lihan kaltaiseksi kudokseksi poistaa suonituksen tarpeen, joka ilmenee suurempien lihaskudosten kasvattamisessa. Näin pystyttäisiin helpommin koostamaan luonnollisen kaltaisia isompia rakenteita. Solulevytekniikka on tutkimuksista huolimatta vielä hyvin alkuvaiheissa. Vaikka tuotetut solulevyt pystyvät kestävänsä automatisoinnin vaatiman fyysisen rasituksen, vaatii solulevyjen keskinäinen asettelu kasauksessa kehitystä monien muiden ominaisuuksien lisäksi. (Shahin-Shamsabadi ja Selvaganapathy 2022.) Solulevyjä voidaan väittää tehottomaksi lihan tuoton tavaksi muun muassa sen rajautuvan skaalautuvuuden vuoksi (Pajčín ja muut 2022). Solulevykasvatustekniikasta löytyy silti monia mielipiteitä puolesta ja vastaan.

4 Tuotanto

Solujen määrän lisääntyminen kasvatuksen alussa on tärkeää, jotta tuotanto pystytään laajentamaan teolliseen mittakaavaan. Progenitorisolujen määrän lisääntyä tarpeeksi pitkälle ne voivat erilaistua tiettyyn solutyyppiin, josta soluliha muodostuu. Auttaakseen tätä erilaistumisprosessia, solut voidaan myöhemmin istuttaa biologisesti yhteensopiviin biologisiin rakenteisiin, joihin lihassolut voivat kiinnittyä ja kasvaa. (Reiss ja muut 2021.)

Jotta prosessi saataisiin kannattavaksi, sen olosuhteet on optimoitava kasvatukselle. Tämä onnistuu tunnistamalla tärkeitä ravintoaineita ja pienmolekyylejä sekä oikea kasvatuksen mikroympäristö. Tuottosoluja on mahdollista kasvattaa kasvatusliuoksessa vapaana suuremmissakin määrin ennen solujen erilaistumista ankkuririippuvaisiksi soluiksi. (Reiss ja muut 2021.)

4.1 Bioreaktorit

Bioreaktorit ovat suljettuja, automatisoituja systeemejä, joissa solut voivat lisääntyä, erilaistua ja kypsyä muodostaen samalla kudosta. Bioreaktorien avulla voidaan kontrolloida kasvatukseen vaikuttavia muuttujia, kuten lämpötilaa, hapen konsentraatiota, pH:ta ja solutiheyttä tarkasti (Lanzoni ja muut 2022). Vuonna 2023 markkinoille ei ole vielä saapunut kaupallisia bioreaktoreita, jotka olisivat spesifisesti suunniteltu solumaatalouden sovelluksiin (Ge ja muut 2023). Eri bioreaktoryyppejä on tästä huolimatta sovellettu solumaatalouteen sopiviksi, vaikkakin niiden kehitys on vielä suhteellisen alkutekijöissä.

Jokaisella reaktoryypillä on omat etunsa ja heikkoutensa. Tällä hetkellä alalla pääasiassa käytössä olevat bioreaktorit ovat sekoitusreaktoreita (engl. stirred tank reaktor, STR), joissa solut leijuvat vapaana tai yleisimmin kiinnittyneinä mikrokantajiin (Ge ja muut 2023). STR on helposti skaalautuva. Kasvatuksen sekoitus auttaa solujen kasvussa ja kehityksessä. STR:t sekoittavat kasvatusta sekoittajien avulla, jotka voivat pyörrevirtauksien lisäksi aiheuttaa kontaktissa solujen kanssa fyysistä vahinkoa niille. Lisäksi sekoituksen aiheuttama nestekitka tuottaa vahinkoa soluille. (Reiss ja muut 2021.)

Tehtyjen tutkimusten perusteella vaikuttaa kuitenkin siltä, että tiettyyn pisteeseen saakka ulkoinen solujen rasitus edistää solujen lisääntymistä ja erilaistumista, mutta tämä tapahtuu solujen lisääntymisen ja itseuudistumisen kustannuksella. Kriittisen pisteen saavuttamisen jälkeen solukuolema ja solujen irtoaminen yleistyvät huomattavasti. (Ge ja muut 2023.) Toisaalta liian vähäinen sekoitus voi johtaa muun muassa solujen ja mikrokantajien aggregoitumiseen sekä ravinteiden epätasaiseen jakautumiseen säiliössä.

Aggregoitumista voidaan sekoituksen lisäksi estää lisäämällä uusia mikrokantajia seokseen, jotta solut vaihtaisivat mikrokantajaa. (Pajčin ja muut 2022.)

STR:t valmistetaan yleensä ruostumattomasta teräksestä, sillä ne on helppo puhdistaa ja kestävät hyvin painetta ja korroosiota. Viime vuosina niitä on valmistettu myös muun muassa polykarbonaatista. STR:n käyttö helpottaa myös solujen erottamista mikrokantajista sen voimakkaan sekoituskyvyn vuoksi. Toisaalta STR:in energiankulutus on yleensä muita reaktortyyppiä suurempi, mikä johtuu muun muassa sekoituksen aiheuttamasta fyysisestä stressistä. Tämän vuoksi reaktortyyppi ei sovi herkästi vaurioituville soluille. Kokonaisuudessaan STR:n rakentaminen ja ylläpito ovat hyvin kalliita. Tämä on suosituin reaktortyyppi nisäkässolujen kasvatukseen. (Ge ja muut 2023.)

Pakatussa petireaktorissa eli putkivirtausreaktorissa solut on kiinnitetty immobilisoituun materiaaliin. Kasvatusliuos virtaa tämän läpi. Putkivirtausreaktoreilla saavutetaan hyvä pinta-ala–tilavuus-suhde ja solutiheys. Kasvatusliuoksen virtaus takaa myös hyvän ravintoaineiden saannin ja estää solujen fyysisistä stressiä. (Ge ja muut 2023.) Tässä reaktortyyppissä ei siis ole soluja vahingoittavia sekoittimia, vaan sekoittuminen tapahtuu nestevirtauksen avulla. Tätä reaktortyyppiä harvemmin käytetään kudosten tuottamiseen, mutta se voisi soveltua kasvatusten laajentamiseen, mikäli sen ominaisuudet saataisiin optimoitua solutyypeille (Pajčin ja muut 2022).

Onttokuitureaktorien etuna on solujen kiinnittyminen huokoisten mikrokuitujen ulkopinnalle, jolloin kasvatusliuos kulkee kuidun sisäkautta soluille diffuusion avulla. Tämä reaktortyyppi ei ole vielä ideaali ankkuririppuvaisille soluille, sillä vielä harvat membraanimateriaalit tukevat solujen sitoutumista niihin. Reaktorin volyymin kasvatus tuo myös haasteita, sillä kuitujen pituuden kasvaessa reaktoriin syntyy hapen, ravinteiden ja jätteiden gradientti, jotka johtavat epätasaisiin kasvuolosuhteisiin. Tätä voidaan jossain määrin estää kasvuliuoksen virtaussuunnan vaihtamisella ajoittain, mutta solujen saanto on STR:ää heikompi. (Ge ja muut 2023.) Onttoputkireaktorit sopivat lähinnä solutuotantoon, eikä niissä voida valmistaa valmiita kudoksia. Ne ovat ideaaleja hyvin metabolisille solutyypeille, mutta niiden käyttö on toistaiseksi rajoittunut lähinnä tutkimuskäyttöön. (Reiss ja muut 2021.) Oikeiden materiaalien kehittyessä on oletettavissa, että onttokuitureaktorista löytyy hyvät ominaisuudet solulihatutuotantoon.

Perfuusioreaktoreissa soluilla on käytössään jatkuva virta uutta kasvatusliuosta, joka auttaa myös kasvatuksen jätteiden, kuten laktaatin ja ammoniumin poistamista (Ge ja muut 2023). Vaikka kasvatusliuos pystyy virtaamaan säiliön läpi alhaalta ylös ja

solujätettä sekä käytettyä mediumia voidaan poistaa säiliöstä, solujen poistuminen säiliöstä on estetty. Liuoksen läpivirtausnopeus säiliössä voidaan säätää kasvatettavan kudoksen tyypin ja koon perusteella ja tämä onkin lupaava tapa määritellyn kokoisten lihatuotteiden tuotantoon. Läpivirtausnopeus kasvaa lineaarisesti tukirakenteen skaalan ja koon mukaan. Kun fyysinen stressi, kuten nesteen aiheuttama kitka kasvaa ja reaktorin paine laskee, seurauksena voi olla solukuolema. (Reiss ja muut 2021.)

Jatkuvan kasvatusliuoksen syötön vaihtoehtona on panoskasvatus. Panoskasvatuksessa laitetaan aluksi panos eli tietty määrä kasvatusliuosta ja soluja reaktoriin. Näiden annetaan kasvaa maksimisolutiheuteen, jolloin solut erotetaan käyttöä varten tai siirretään suurempaan bioreaktoriin. Syöttöpanoskasvatuksessa solujen lisääntymisen maksimoimiseksi annetaan soluille tietyn ajan välein lisää kasvatusliuosta niin, etteivät solujen ravintoaineet pääse loppumaan ja kasvatusta pystytään jatkamaan. (Reiss ja muut 2021.) Tässä vaarana on kasvatusolosuhteiden vaihtelu ja kasvatuksen jätteiden kerääntyminen (Ge ja muut 2023).

Jatkuvan kasvatuksen etuina ovat mahdollisuus minimoida kulut, helpottaa skaalausta, helpompi standardisointi ja tuotteen tasalaatuisuus. Tämä on saavutettu jo terapeuttisilla proteiineilla. (Pajčin ja muut 2022.) Lisäksi jatkuvien kasvatusmuotojen automatisointi ja kasvatusliuoksen kierrätys on helpompaa. Eri kasvatusliuoksen syöttötapoja voidaan soveltaa moniin eri reaktorityyppeihin. Lisäksi reaktoreista voidaan tehdä mekaanisesti aktiivisia. Ne voivat sisältää kontrolloitavan mekaanisen voiman, kuten soluihin kohdistuvan aktiivisen paineen, joka auttaa jäljittelemään solun alkuperäisiä kasvuolosuhteita ja vahvistamaan solua. (Reiss ja muut 2021.)

4.2 Kasvatusliuos

Suurimmat ongelmat kasvatusliuosta muodostettaessa on solujen erilaistumisen mahdollistaminen ja ympäristöystävällisyys, joista jälkimmäinen on yksi keskeinen ongelma solulihan tuotannossa (Pajčin ja muut 2022). Kasvatusliuos koostuu pääasiassa ravinteista, kasvutekijöistä ja muista kasville tärkeistä aineista. Kasvatusliuoksissa käytetään useita eläinperäisiä ja määrittelemättömiä komponentteja, kuten naudun sikiön seerumia (engl. fetal bovine serum, FBS), joka aiheuttaa kontaminaatoriskin lisäksi eettisiä ongelmia. (Ge ja muut 2023.) Kasvatusliuokseen on lisäksi lisättävä säilöntäainetta, kuten natriumbentsoaattia ehkäisemään hiivojen ja sienien kehittymistä (Warner 2019). Muutamia käytettyjä kasvatusliuos pohjia ovat IMDM, RPMI1640, and DMEM (Lanzoni ja muut 2022).

Eläinperäisten komponenttien aiheuttamia muuttuvia tekijöitä ovat muun muassa eri erien ja eläinlajikohtaiset eroavaisuudet, joita ei voida ennakoida. Eläinperäisissä komponenteissa on myös riski virus- ja prionikontaminaatioon. (Reiss ja muut 2021.) Nämä komponentit tulisi kyetä korvaamaan kemiallisesti määritellyillä komponenteilla. Kasvatusliuoksen peruskoostumus pysyy silti samana lajista ja solutyypistä riippumatta (Reiss ja muut 2021).

Aikuisen kantasolut ja ensisijaisen solulähteen solut vaativat hieman eri kokoonpanon kasvutekijöitä. Näistä juuri lihaskudoksen tuotannolle oleellimmat vaikuttavat olevan hepatosyyttikasvutekijät (engl. hepatocyte growth factor, HGF), insuliinin kaltaiset kasvutekijät (engl. insulin-like growth factor, IGF), trombosyyttikasvutekijät (engl. platelet-derived growth factor, PDGF) ja fibroblastikasvutekijät (engl. fibroblast growth factor, FGF) (Ge ja muut 2023). Myös transformoiva kasvutekijä beeta (engl. transforming growth factor β , TGF- β) ja tuumorinekroositekijä alfa (engl. tumor necrosis factor- α , TNF- α) ovat tärkeässä osassa solujen erilaistumisprosessissa. (Pajčin ja muut 2022.)

Lihassolujen erilaistumisessa myoblastit erilaistuvat ja yhdistyvät ensin lihassyiksi. Tätä varten solut tarvitsevat useita kasvutekijöitä, kuten HGF, TGF- β , FGF ja IGF. FGF-2 on tunnettu satelliittisolujen erilaistumisen ja lisääntymisen kiihdyttäjä. IGF edellisten toimintojen lisäksi stimuloi proteiinisynteesiä. TGF- β 1 estää solujen lisääntymistä ja, TNF- α edistää myoblastien erilaistumista. (Pajčin ja muut 2022.) Muita kasvutekijöitä tarvitaan muissa kasvatuksen vaiheissa.

On arvioitu että 55-95 % tuotteen hinnasta aiheutuu kasvutekijöistä ja 95% kasvatusliuoksen hinnasta syntyy kasvutekijöistä (Pajčin ja muut 2022). Kasvutekijöistä FGF-2 ja TGF- β ovat välttämättömiä kasvuliuoskomponentteja ja muodostavat samalla noin 90 % kasvatusmediumin hinnasta. Hintaa saadaan laskettua kasvatusliuoksen kierrättämisellä reaktorin vaihtuessa suurempaan. Tämä käytetty kasvatusliuos sisältää myös solujen metabolian tuotteita ja soluväliaineproteiineja, jotka ovat tärkeitä tekijöitä solujen viestinnässä sekä auttavat solujen lisääntymisessä ja erilaistumisessa, kun niitä käytetään yhdessä tuoreen kasvatusliuoksen kanssa. (Reiss ja muut 2021.)

Kasvatusliuoksen koostumus on oltava tarkoin määritelty. Liian korkea glukoosipitoisuus voi johtaa asidoosiin ja huonontaa lihan laatua. D-vitamiinin puute voi aiheuttaa lihaskudoksen rappeutumista ja seleenin sekä E-vitamiinin puute voi aiheuttaa myopatiaa eli lihasta heikentävää sairautta. (Pajčin ja muut 2022.)

Eläinperäisiä seerumeja, kuten naudan sikiön seerumia (FBS) on käytetty useasti lisänä kasvatuliouksiin, sillä se sisältää laajan kirjon rasvahappoja, lipidejä, vitamiineja, hiilihydraatteja, suoloja, kasvutekijöitä, proteiineja ja muita ravintoaineita, jotka ovat tarpeellisia solun kasvulle ja kiinnittymiseen. Seerumia voidaan käyttää ohjaamaan solun käyttäytymistä, koska usein sen poisto kasvatuliouksesta käynnistää lihasprogenitorisolujen erilaistumisen luurankomyosyyteiksi. Toisaalta FBS on myös eläinperäinen komponentti, joka aiheuttaa monia eettisiä kysymyksiä. Lisäksi se on myös hyvin kallista. (Reiss ja muut 2021; Lanzoni ja muut 2022.)

4.3 Kasvuolosuhteet

Lihan aistittaviin ominaisuuksiin vaikuttavat useat tekijät kuten lämpötila, kasvatuliouksen lisäravinteet, CO₂-osapaine ja hapen osapaine reaktorissa. (Ge ja muut 2023.) Aistittaviin ominaisuuksiin kuuluvat kaikki havaittavat ominaisuudet, kuten ulkonäkö, haju, maku ja koostumus.

Lämpötilan vaikutus lihan makuun ja koostumukseen voi olla hyvinkin suuri. Käytetyt solut, kasvatuliuos ja kasvatulosuhteet vaikuttavat kasvatuksen optimilämpötilan valintaan. Kasvatuksen aikana lämpötilaa säädetään tarkasti kasvun ja laadun kannalta parhaaksi, eikä siinä oteta huomioon eläimen kokemia vuodenajan ja lämpötilan vaihteluita. Yleisesti korkean kasvatulämpötilan on huomattu tuottavan selkeämmän lihan maun ja kiinteämmän koostumuksen. (Ge ja muut 2023.)

Eläimen ravinto vaikuttaa lihan makuun. Tätä eläimen ravinnon vaikutusta voidaan jäljitellä reaktorissa säätämällä ja lisäämällä kasvatulioukseen eri ravintoaineita, joita löytyy myös eläimen ravinnosta, kuten eri viljoista. Käyttämällä eri viljoille tyypillisiä aineita voidaan lihan makuprofiilia muuttaa. (Ge ja muut 2023.)

Happi on yksi tärkeimmistä ravinteista soluille. Liian suuri liuenneen hapen määrä voi kuitenkin johtaa oksidatiiviseen stressiin, joka voi vahingoittaa soluja ja niiden toimintaa. Tämän vuoksi reaktoreihin sisällytetään usein happiantureita, joiden avulla hapen pitoisuutta voidaan kontrolloida. (Ge ja muut 2023.)

Varsinkin suurien kasvatuksien sekoituksessa syntyy kasvatuksen pinnalle vaahtoa ja reaktoriin kertyy helposti solujätettä kuten laktaattia. Vaahtoa syntyy mikrokokoisista kuplista ja proteiinien denaturaatiosta. Solujätettä syntyy solujen metabolian tuloksena CO₂:n lisäksi. Vaahtokerroksessa solujen kasvu vaarantuu vaihtelevan ravinteiden määrän, eri pH:n ja suoran kaasukosketuksen vuoksi. Tämän vuoksi vaahton syntymistä pyritään vähentämään vaahtonestoaineella. (Pajčin ja muut 2022.)

Vaahdonestoaineen lisääminen aiheuttaa kaasukuplien yhteen sulautumisen vähentäen samalla liuenteen hapen määrää. Lisäksi se vähentää solujen hydrofobisuutta ja täten niiden kiinnittymistä. Käytettävän vaahdonestoaineen määrää voidaan vähentää suihkuttamalla sitä suoraan vaahdon päälle. Solujätteet ja CO₂ muuttavat kasvatuksen pH:ta. pH:n muutokset voivat aiheuttaa ongelmia muun muassa ravintoaineiden liukoisuudessa, mikä voi häiritä solujen kasvua. pH:n muutokset voivat myös suoraan aiheuttaa vahinkoa soluille. Tämän vuoksi reaktorissa on oltava pH-mittari varmistamassa kasvulle oikeaa pH:ta. (Pajčin ja muut 2022.)

5 Solulihan ominaisuudet

Koska soluliha pyrkii jäljittelemään perinteistä lihaa, ovat koostumus, väri ja maku erittäin tärkeitä lihan ominaisuuksia. Tällä hetkellä kasvatettu soluliha ei pysty vielä täysin jäljittelemään luurankolihasta varsinkaan rakenteeltaan. Tästä syystä solulihaa voidaan toistaiseksi hyödyntää lähinnä prosessoiduissa lihatuotteissa. (Warner 2019.)

Koska käytettyjen kasvuliuosten rautapitoisuus on hyvin matala ja solulihan myoglobiinin tuotanto kasvatuksen korkeissa happipitoisuuksissa vähentynyt, soluliha on väriltään kellertävää. Lihan punaista väriä pystytään jäljittelemään lisäämällä kasvatusliuokseen rautaa. (Lanzoni ja muut 2022.) Lisäksi väriä voidaan parantaa käyttämällä kasvipohjaista hemiä, joka on hemoglobiinin happea sitova komponentti (Shahin-Shamsabadi ja Selvaganapathy 2022).

Lihan koostumuksessa tärkeää on varsinkin sen jäykkyys, joka muuttuu lämpötilan muutoksen takia, kun proteiinit denaturoituvat eri lämpötiloissa. Lämmön nouseminen aiheuttaa kutistumista lihaan mikro- ja makrotasolla. Adiposyytit ovat päärasvanlähde lihaskudoksessa ja ne ovat tärkeitä aromin, maun ja mehevyyden tuottajia. Valitettavasti useita solutyyppejä, kuten lihas- ja rasvasoluja ei ole vielä voitu kasvattaa yhdessä reaktorissa. (Warner 2019.)

Koska solulihan kasvatusliuos sisältää paljon glukoosia, sisältää lopputuote monesti myös perinteistä lihaa enemmän hiilihydraatteja. Kasvatusliuoksen glukoosia vähentämällä voidaan mahdollisesti vähentää lihan hiilihydraattipitoisuutta, tehden siitä terveellisempää. Lopullinen solulihan koostumus erii perinteisestä lihasta myös sen nestepitoisuuden puolesta. (Tanaka ja muut 2022.) Tanaka ja muut huomasivat tutkimuksessaan solulevytekniikalla valmistetun lihan sisältävän yli 20 % enemmän nestettä kuin perinteinen naudan liha ja että lihan muutkin ominaisuudet, kuten pureskeltavuus erosivat vielä paljon, vaikka osa solulihan ominaisuuksista oli jopa parempia kuin perinteisen lihan.

6 Loppuyhteenveto

Solulihan tuotanto on lupaava prosessi, joka vaatii vielä hyvin paljon kehitystä, jotta se saavuttaisi perinteisen lihan laadun, kannattavuuden, sekä kaupallisen myyntistatuksen. Tämänhetkisen teollisuusskaalan tuotannon esteenä on vielä korkeat kustannukset, jotka eivät mahdollista vastaavien tuotteiden kanssa kilpailua markkinoilla. Jotta laajempi solulihantuotanto olisi taloudellisesti kannattavaa, on prosessin hintaa laskettava, löydettävä tuotantoon paremmin soveltuvia solulinjoja ja tuotettavan lihan saavutettava muiden kaupallisessa myynnissä olevien biotuotteiden ravintoarvot, sekä kuluttajalle miellyttävät havaittavat ominaisuudet.

Hinnan laskemisen kannalta tärkeimpiä kehityksen kohteita ovat halvemmat tuotantoreaktorit ja kasvatusliuoskomponentit. Suuren reaktorin, kuten ST-reaktorin rakennuttaminen on kallis prosessi, jolle pitäisi löytää halvempi ja ympäristöystävällinen tuotantovaihtoehto. Kasvatusliuoskomponenttien hintaa voisi mahdollista saada alemmas löytämällä kemiallisesti määriteltäviä komponentteja, joita voitaisiin tuottaa kemiallisesti.

Tällä hetkellä ei ole olemassa kaupallista solulihayritystä, jonka tuotannon pohjalta solulihan tuotannon ympäristövaikutuksia voisi mitata, mutta tuotannon on laskelmoitu olevan kaikilta kannoilta ympäristöystävällisempää, kuin perinteinen lihantuotanto. Tuotannon pääpaino on toistaiseksi ollut liha-aggregaattien ja solumassan tuotannossa, sillä luurankolihasen kaltaisen kudoksen luominen on yllättävän haastavaa. Tätä varten olisi ratkottava useiden solutyypin yhteiskasvatus ja miten lihan suonitus saadaan aikaiseksi ravintoaineiden tasaisen jakelun saavuttamiseksi lihan keskellekin. Nämä voisivat ratkoa myös maun ja rakenteen kannalta oleellisia ongelmia.

Hinnan lisäksi ratkaisuja tulisi löytää eettisiin kysymyksiin. Avainasemassa ovat eläinperäiset kasvatukseen käytettävät komponentit, jotka epäeettisyytensä lisäksi nostavat prosessin kustannuksia. Eläinperäisten komponenttien tuotto aiheuttaa eläimille kärsimystä ja ne aiheuttavat tuotantoon prioni- ja viruskontaminaation riskin. Tämän vuoksi kemiallisesti määriteltävien komponenttien löytäminen on tärkeää.

Mikäli tärkeitä ongelmia saadaan ratkottua, voisi solumassaa hyödyntää useissa prosessoiduissa lihatuotteissa perinteisen lihan sijaan. Esimerkiksi kananugeteissa tai eläinten ravinnossa, kuten kissan ruuassa, voisi solulihamassa toimia hyvin. Lihaskudoksen valmistamiseen on hyvin pitkä matka ja nähtäväksi jää, löytyykö sen tuottamisen ongelmiin ratkaisuja vielä pitkään aikaan.

7 Kirjallisuus

- Datar, I. & Betti, M. (2010) Possibilities for an in vitro meat production system. *Innov Food Sci Emerg Technol* **11**:13–22.
- Ge, C., Selvaganapathy, P. R. & Geng, F. (2023) Advancing our understanding of bioreactors for industrial-sized cell culture: Health care and cellular agriculture implications. *Am J Physiol-Cell Physiol* **325**:C580–C591.
- Lanzoni, D., Bracco, F., Cheli, F., Colosimo, B. M., Moscatelli, D., Baldi, A., ... Giromini, C. (2022) Biotechnological and Technical Challenges Related to Cultured Meat Production. *Appl Sci* **12**:6771.
- Melzener, L., Verzijden, K. E., Buijs, A. J., Post, M. J. & Flack, J. E. (2021) Cultured beef: From small biopsy to substantial quantity. *J Sci Food Agric* **101**:7–14.
- Pajčin, I., Knežić, T., Savic Azoulay, I., Vlajkov, V., Djisalov, M., Janjušević, L., ... Gadjanski, I. (2022) Bioengineering Outlook on Cultivated Meat Production. *Micromachines* **13**:402.
- Qu, Z.-H., Wang, H.-J., Tang, T.-T., Zhang, X.-L., Wang, J.-Y. & Dai, K.-R. (2008) Evaluation of the zein/inorganics composite on biocompatibility and osteoblastic differentiation. *Acta Biomater* **4**:1360–1368.
- Reiss, J., Robertson, S. & Suzuki, M. (2021) Cell Sources for Cultivated Meat: Applications and Considerations throughout the Production Workflow. *Int J Mol Sci* **22**:7513.
- Shahin-Shamsabadi, A. & Selvaganapathy, P. R. (2022) 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**:304–312.
- Tanaka, R., Sakaguchi, K., Yoshida, A., Takahashi, H., Haraguchi, Y. & Shimizu, T. (2022) Production of scaffold-free cell-based meat using cell sheet technology. *Npj Sci Food* **6**:41.
- Warner, R. D. (2019) Review: Analysis of the process and drivers for cellular meat production. *Animal* **13**:3041–3058.
- Yang, F., Wang, S., Li, Y., Li, S., Liu, W., Li, Y. & Hu, H. (2022) Physical optimization of cell proliferation and differentiation using spinner flask and microcarriers. *AMB Express* **12**:63.