



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E
AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE
ALIMENTARI

IL FUTURO DELLA CARNE SINTETICA: SVILUPPI
TECNOLOGICI, IMPATTI ECOLOGICI E
ASPETTATIVE

THE FUTURE OF SYNTHETIC MEAT:
TECHNOLOGICAL DEVELOPMENTS, ECOLOGICAL
IMPACTS AND EXPECTATIONS

TIPO TESI: compilativa

Studente:
Alessio Tomasetti

Relatore:
PROF. NADIA RAFFAELLI

ANNO ACCADEMICO 2023-2024

SOMMARIO

ELENCO DELLE FIGURE	4
ACRONIMI E ABBREVIAZIONI	5
INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI	7
CAPITOLO 1: COMPOSIZIONE STRUTTURALE DELLA CARNE.....	8
1.1 Composizione strutturale della carne.....	8
1.2 Fibre muscolari.....	9
1.3 Componente grassa.....	10
1.4 Miogenesi.....	10
1.5 Sistema vascolare.....	11
CAPITOLO 2: ASPETTI SCIENTIFICI E TECNOLOGICI DEL PROCESSO DI PRODUZIONE.....	12
2.1 Processo di produzione	12
2.2 Cellule staminali adulte.....	14
2.3 Cellule staminali pluripotenti.....	15
2.4 Cellule staminali adulte contro cellule staminali pluripotenti.....	16
2.5 Fattori di crescita.....	17
2.6 Tecniche in co-cultura.....	20
2.7 Ruolo dei bioreattori.....	21
2.7.1 Stimoli elettrici	25
2.8 Ruolo degli scaffold.....	26
2.8.1 Scaffold in idrogel.....	28
2.8.2 Auto-organizzazione	30
2.9 Biostampa	30
2.10 Ostacoli nel percorso.....	31
CAPITOLO 3: IMPATTO AMBIENTALE.....	34

3.1 Influenza sull'impronta ecologica.....	34
3.2 L'alternativa sostenibile alla produzione tradizionale.....	35
Capitolo 4: POSSIBILITA' FUTURE DELLA CARNE SINTETICA.....	39
4.1 Sicurezza.....	39
4.2 Proprietà nutrizionali.....	40
4.3 Influenze sull'accettazione della carne coltivata.....	41
4.4 Sfida alla tradizione alimentare Europea.....	44
Capitolo 5: ASPETTI ECONOMICI.....	46
5.1 Il mercato della carne sintetica.....	46
CONCLUSIONI.....	48
BIBLIOGRAFIA.....	50
Documenti e siti consultati.....	50
Referenze citate dai documenti consultati.....	56
RINGRAZIAMENTI.....	65

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1: Rappresentazione schematica della struttura del muscolo	9
Figura 2: Flusso di lavoro generale per la produzione di carne coltivata.....	13
Figura 3: Da cellule satelliti a fibre muscolari.....	15
Figura 4: Random scaffold da tessuto muscolare decellularizzato.....	27
Figura 5: Esempio di scaffold in idrogel 3D.....	29
Figura 6: Gas serra prodotti dal settore zootecnico.....	35
Figura 7: Crescita stimata del consumo globale di carne entro il 2030.....	36
Figura 8: Fattori che contribuiscono all'accettazione della carne artificiale.....	46

ACRONIMI E ABBREVIAZIONI

MSC = CELLULE STROMALI MESENCHIMALI

FAP = PROGENITORI FIBRO/ADIPOGENICI

iPSC = CELLULE STAMINALI PLURIPOTENTI INDOTTE

ESC = CELLULE STAMINALI EMBRIONALI

FBS = SIERO FETALE BOVINO

3DBP = 3D BIOPRINTING

PFC = PERFLUOROCIMICI

DMEM = TERRENO EAGLE MODIFICATO DI DULBECCO

FGF = FATTORE DI CRESCITA DEI FIBROBLASTI

EGF = FATTORE DI CRESCITA EPIDERMICO

TGF = FATTORE DI CRESCITA TRASPARENTE

GHG = GAS A EFFETTO SERRA

Alla mia famiglia, per avermi insegnato il valore del sacrificio
e poi avermi sostenuto in ogni passo
Ai miei compagni di studio, che hanno condiviso con me sfide, notti insonni e momenti
indimenticabili,
e a me stesso per aver continuato a provare.

INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI

La carne sintetica, conosciuta anche come carne coltivata, rappresenta una delle innovazioni più promettenti e controverse nel campo dell'alimentazione e della sostenibilità. Si tratta di un prodotto ottenuto attraverso la coltivazione di cellule animali, senza necessità di allevare o macellare animali. Questa tecnologia emergente nasce come risposta a sfide globali sempre più urgenti, come la crescente domanda di carne, l'impatto ambientale dell'allevamento intensivo e le preoccupazioni etiche legate al trattamento degli animali. Attraverso la coltivazione di cellule muscolari in condizioni controllate, la carne sintetica mira a offrire una fonte di proteine che possa ridurre drasticamente l'emissione di gas serra, il consumo di acqua e l'uso di suolo associati alla produzione di carne tradizionale. Inoltre, si presenta come un'alternativa che potrebbe contribuire a risolvere il problema della sicurezza alimentare globale, fornendo carne di alta qualità in modo più efficiente e sostenibile. In questa tesi, esamineremo i principi scientifici alla base della produzione di carne sintetica, il suo potenziale impatto sull'ambiente e la società, e le sfide economiche e normative che accompagnano la sua diffusione. Approfondiremo anche le implicazioni etiche e culturali, analizzando come questa innovazione possa ridefinire il nostro rapporto con il cibo e il mondo animale.

Capitolo 1

COMPOSIZIONE STRUTTURALE DELLA CARNE

1.1 Composizione strutturale della carne

Per produrre carne sintetica è particolarmente importante capire come la struttura muscolare sia correlata alle proprietà nutrizionali e organolettiche della carne. La tessitura fibrosa associata alla carne deriva da una complessa struttura tissutale gerarchica. I principali determinanti della struttura e della qualità muscolare sono le fibre muscolari, il grasso e i tessuti connettivi (Listrat. et al., 2016). L'unità funzionale principale è la fibra muscolare, chiamata anche miofibra, che è circondata da tessuto connettivo, grasso intramuscolare, vasi sanguigni e nervi.

Le fibre muscolari sono organizzate in fasci chiamati fascicoli. Il tessuto connettivo è separato in endomisio, perimisio ed epimisio, che circondano rispettivamente le fibre muscolari, i fascicoli e interi muscoli (Fig. 1).

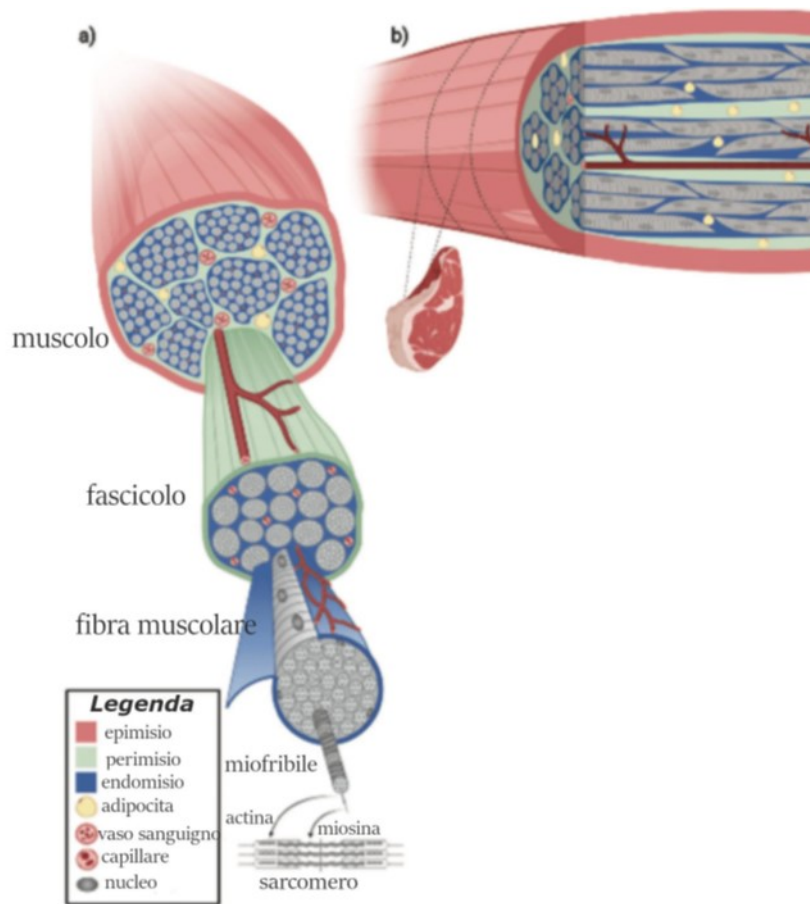


Figura 1: Rappresentazione schematica della struttura del muscolo

1.2 Fibre muscolari

All' interno delle fibre muscolari, sono presenti miofibrille simili a cavi, costituite da fasci di filamenti contrattili formati da lunghe catene di actina e miosina (Bomkamp et al., 2022).

I filamenti sono organizzati in unità funzionali chiamate sarcomeri, che svolgono il ruolo principale nella contrazione muscolare. L'organizzazione dei filamenti di actina e miosina nelle miofibrille conferisce alle cellule muscolari il caratteristico aspetto striato. Le fibre muscolari rosse contengono più mioglobina rispetto a quelle bianche, rendendole una fonte più ricca di ferro eme, un tipo di ferro altamente biodisponibile (Listrat. et al., 2016).

1.3 Componente grassa

I grassi intramuscolari sono un fattore determinante per la succosità, il sapore e la nutrizione della carne e contribuiscono alla tenerezza attraverso vari meccanismi (Bomkamp et al, 2022) (Listrat. et al., 2016). Il grasso intramuscolare è presente negli adipociti, che si trovano

incorporati nel tessuto muscolare tra le fibre muscolari e i fascicoli. Il grasso intramuscolare comprende anche lipidi strutturali, e cioè i fosfolipidi. Inoltre, può formare goccioline lipidiche intracellulari all'interno delle fibre muscolari. Il grasso è nutrizionalmente importante come fonte di vitamine lipofile A, D, K ed E e di lipidi essenziali come gli acidi grassi polinsaturi della serie omega-3 polinsaturi (Bomkamp et al., 2022).

Il contenuto di grasso intramuscolare varia in base a fattori tra cui specie, tipo di muscolo, razza e apporto nutritivo. Anche la dimensione media degli adipociti animali è eterogenea e dipende dall'accumulo di lipidi intracellulari (Bomkamp et al., 2022).

1.4 Miogenesi

Per miogenesi si fa riferimento al processo di formazione delle fibre muscolari. Le fasi dello sviluppo del sistema neuromuscolare sono:

- Formazione dei mioblasti, ovvero i precursori delle cellule muscolari.
- Fusione dei mioblasti l'uno con l'altro formando piccole cellule polinucleate chiamati i miotubuli. Durante l'aggregazione le estremità dei miotubuli crescono fino ad arrivare a 100-300 um di lunghezza. Le prime strutture che andranno a formarsi verranno chiamate miotubuli primari.
- Riunione dei miotubuli in fascicoli, ricoperti da una membrana chiamata lamina basale. Altri mioblasti si fondono tra di loro e si aggregano ai miotubuli primari posizionandosi al di sotto della lamina basale. Queste ultime strutture si chiamano miotubuli secondari, la fusione radiale e longitudinale dei mioblasti al di sotto della lamina basale provoca la formazione delle fibre muscolari. Alcuni mioblasti non utilizzati rimangono come cellule satellite che verranno incorporate nelle cellule mature.
- Sintesi delle proteine contrattili (actina, miosina) prima nei miotubuli primari, e poi in quelli secondari, che spingono i nuclei verso l'esterno. A questo punto le fibre muscolari sono mature e pronte per essere innervate.
- Crescita del muscolo; le fibre si dispongono l'una vicina all'altra formando una struttura compatta caratteristica del muscolo adulto.

All'interno di una cultura cellulare, la maggior parte dei mioblasti tende a proliferare se sono presenti fattori di crescita. Quando esso si esaurisce, i mioblasti cessano la divisione e subiscono una differenziazione terminale in miotubi.

1.5 Sistema vascolare

Sebbene il sistema vascolare non contribuisca sostanzialmente alle proprietà organolettiche, il suo ruolo nel facilitare il trasporto di ossigeno, nutrienti e rifiuti dovrà essere tenuto in considerazione durante il processo produttivo (D.Gholobova et al., 2020) (S.Levenberg et al., 2005) (J.R. Gershlak et al., 2017).

Similmente la riproduzione dei nervi presenti nei muscoli non è fondamentale da un punto di vista organolettico, ma può contribuire alla maturazione delle fibre muscolari (S.Das et al., 2020).

Capitolo 2

ASPETTI SCIENTIFICI E TECNOLOGICI DEL PROCESSO DI PRODUZIONE

2.1 Processo di produzione

La produzione di carne coltivata in laboratorio rappresenta una tecnologia all'avanguardia che consente di ottenere carne senza dover allevare o macellare animali. Questo processo utilizza avanzate tecniche di ingegneria dei tessuti per coltivare cellule animali in un ambiente controllato. Il processo si basa su 3 componenti principali: cellule, segnali e scaffold. Si selezionano fonti e tipi di cellule rilevanti dal punto di vista agricolo, si forniscono segnali esterni necessari per lo sviluppo di queste cellule e si utilizzano impalcature tissutali che supportano la proliferazione e la differenziazione cellulare (Fig. 2).

Poiché la carne coltivata è una tecnologia in fase emergente, il flusso di lavoro standard per la sua produzione è ancora in evoluzione. Al momento è possibile delineare un diagramma generale del processo, ma è importante tenere presente che ogni fase può essere modificata per adattarsi a specifiche applicazioni. Inoltre, ci sono ampi margini di miglioramento sia in termini di scalabilità che di riduzione dei costi. Nel dettaglio, le principali fasi di questo processo includono: il prelievo delle cellule iniziali da animali da allevamento e l'isolamento delle cellule progenitrici specifiche oppure, la selezione dei tipi di cellule muscolari desiderate a partire da cellule staminali, l'espansione massiva delle cellule selezionate in bioreattori e la semina delle cellule su impalcature biocompatibili. Successivamente, le cellule coltivate vengono fatte maturare su queste impalcature, che favoriscono il loro sviluppo, dando al prodotto finale una struttura simile a quella della carne tradizionale. In sintesi, le cellule prelevate vengono ampliate e fatte crescere in bioreattori su larga scala, per poi maturare su supporti tissutali che permettono di ottenere un prodotto di carne coltivata ben strutturato.

Questo processo è in continua innovazione per ottimizzare dimensioni e costi di produzione. Il primo passo nel processo di produzione della carne coltivata consiste nell'ottenimento delle cellule, che può avvenire in due modi principali. Il metodo più comune è eseguire una biopsia

tissutale o utilizzare tessuti post-mortem prelevati dalle aree di interesse di animali da allevamento, conosciuti come fonti cellulari primarie. In alternativa, è possibile utilizzare cellule pluripotenti, come le cellule staminali embrionali o le cellule staminali pluripotenti indotte. Quando si utilizzano cellule primarie, è possibile isolare le cellule progenitrici muscolari dai tessuti muscolari scheletrici prelevati dall'animale. Se, invece, si opta per cellule pluripotenti, queste devono prima essere differenziate per generare cellule progenitrici muscolari. Durante le fasi iniziali di coltura, l'obiettivo principale è stimolare la proliferazione cellulare, in modo da ottenere una quantità sufficiente di cellule per la produzione su larga scala. Per questo scopo si utilizzano bioreattori, dispositivi che supportano l'espansione delle cellule, ottimizzando la distribuzione dei nutrienti e fornendo stimolazioni meccaniche necessarie per il loro sviluppo. Una volta che le cellule progenitrici hanno raggiunto una quantità sufficiente, vengono fatte differenziare in tessuti muscolari maturi, utili alla produzione di carne coltivata. Questo processo viene facilitato dall'impiego di scaffold biocompatibili, ovvero strutture che permettono alle cellule di aderire e maturare, contribuendo a definire la forma e la consistenza del prodotto finale, in modo da riprodurre al meglio la carne tradizionale.

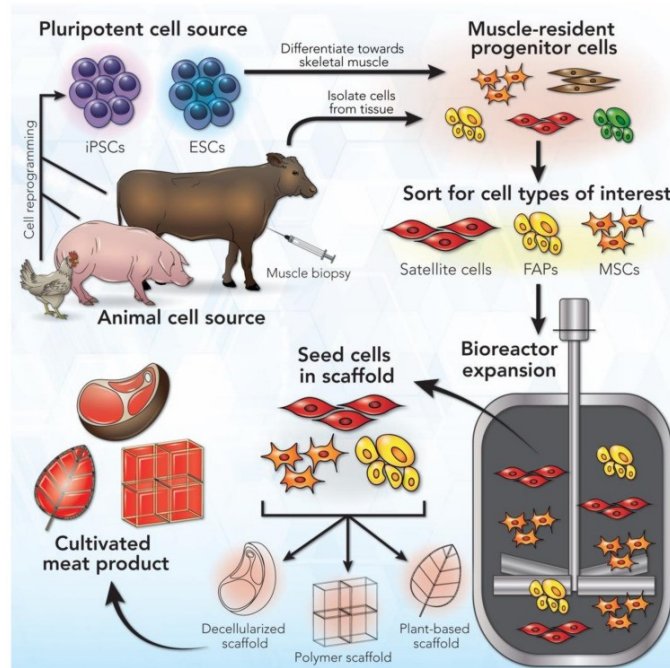


Figura 2: Flusso di lavoro generale per la produzione di carne coltivata (Int J Mol Sci., 2021).

2.2 Cellule staminali adulte

La carne è composta per circa il 90% da fibre muscolari, per il 10% da grasso e tessuto connettivo e per meno dell'1% da sangue, ma può variare a seconda della posizione e della specie del muscolo. Per la produzione di carne coltivata, le cellule devono essere in grado di auto-rinnovarsi per raggiungere quantità adeguate, e quindi avere la capacità di differenziarsi nei tipi cellulari maturi che costituiscono la carne (Listrat et al., 2016) (Warriss & Rhodes., 1977).

Per raggiungere questi requisiti, le cellule staminali sono il candidato più adatto da utilizzare come fonte cellulare di partenza. Le cellule staminali sono cellule non specializzate presenti in tutti gli organismi viventi. Diversamente da una cellula epiteliale, capace di produrre una barriera biologica a difesa del nostro organismo, o da un globulo rosso, in grado di trasportare l'ossigeno attraverso il circolo sanguigno, una cellula staminale non possiede alcuna specializzazione fisiologica. La definizione di cellula staminale si basa essenzialmente su due caratteristiche:

- a) autorinnovamento, ossia la capacità di generare una cellula indifferenziata esattamente uguale alla cellula madre attraverso numerosi cicli cellulari;
- b) potenza, vale a dire la capacità di differenziarsi in tipi cellulari specializzati;

Esistono due tipi principali di cellule staminali che possiedono la capacità proliferativa e il potenziale di differenziazione necessari per la produzione di carne coltivata: cellule staminali adulte e cellule staminali pluripotenti (Gandolfi., 2007).

Le cellule staminali adulte sono state la fonte cellulare più comunemente impiegata per la produzione di carne coltivata. Sono cellule indifferenziate che risiedono in organi e tessuti specifici nelle specie animali. Le cellule staminali adulte sono multipotenti, il che significa che queste cellule hanno la capacità di differenziarsi in un numero selezionato di tipi cellulari, solitamente rilevanti per l'organo o il tessuto in cui risiedono. Tipi specifici di cellule staminali adulte sono maggiormente applicabili alla produzione di carne coltivata. Tra questi, ci sono tre principali tipi di cellule staminali presenti nell'ambiente del tessuto muscolare: cellule satelliti muscolari (Fig. 3), cellule stromali mesenchimali (MSC) e progenitori fibro/adipogenici (FAP). Queste cellule progenitrici hanno la capacità di differenziarsi in uno o più tipi cellulari maturi chiave, vale a dire miociti scheletrici, adipociti, condrociti e fibroblasti (Bentzinger et al., 2012).

Le cellule satelliti muscolari sono cellule staminali residenti nelle fibre muscolari e sono in grado di differenziarsi in miociti, che, a loro volta, formano miotubi che si compattano nelle miofibre. Le cellule satelliti muscolari sono tra le popolazioni di cellule staminali adulte

residenti nei tessuti più abbondanti (Low et al., 2017) (Uezumi et al., 2010) (Uezumi et al., 2011).

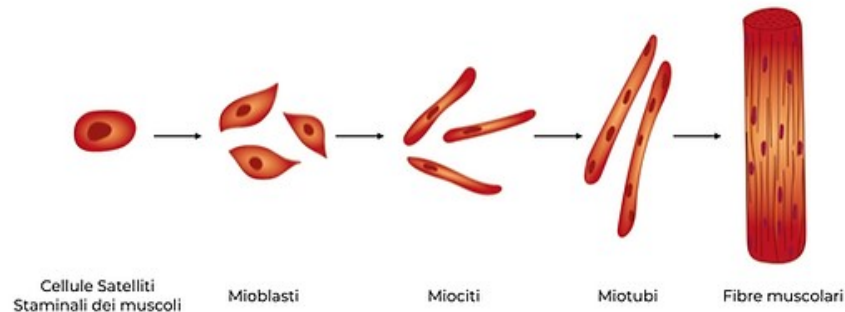


Figura 3: Da cellule satelliti a fibre muscolari (Int J Mol Sci., 2022).

Le MSC derivano più comunemente dal midollo osseo ma possono essere trovate anche in altre sedi anatomiche, compresi i muscoli scheletrici. Le MSC sono in grado di differenziarsi in adipociti, condrociti e fibroblasti. I FAP sono stati considerati come una popolazione di cellule mesenchimali separata che risiede nello spazio interstiziale del muscolo scheletrico (Low et al., 2017) (Uezumi et al., 2010) (Uezumi et al., 2011).

I FAP sono in grado di differenziarsi sia in fibroblasti che in adipociti, che costituiscono i tessuti connettivi e grassi presenti nella carne. Insieme, cellule satellite, MSC e FAP sono in grado di costituire tutti i tipi di cellule presenti nella carne. Sebbene le cellule staminali adulte siano facili da ottenere e possano ancora differenziarsi nei tipi di cellule mature necessarie presenti nella carne, la loro capacità proliferativa e il loro mantenimento sono limitati in vitro (Redondo et al., 2017).

2.3 Cellule staminali pluripotenti

Nonostante le cellule staminali primarie siano attualmente la fonte cellulare più comunemente utilizzata per la produzione di carne coltivata, le cellule staminali pluripotenti hanno un potenziale interessante come seconda opzione di fonte cellulare. Le cellule staminali pluripotenti, vale a dire ESC (cellule staminali embrionali) e iPSC (cellule staminali pluripotenti indotte), sono altamente proliferative in coltura e sono in grado di differenziarsi in qualsiasi tipo di cellula presente nella carne. Gli ESC derivano dalla massa cellulare interna delle blastocisti, che si forma durante le prime fasi dello sviluppo dei mammiferi. Le iPSC

sono generate dalla riprogrammazione cellulare delle cellule somatiche attraverso l'induzione di geni associati alla pluripotenza (Takahashi & Yamanaka., 2006) (Yu et al., 2007).

Le cellule staminali pluripotenti hanno la capacità di trasformarsi in tutti i diversi tipi cellulari presenti nella carne, e offrono il vantaggio di un'elevata capacità di proliferazione. Tuttavia, sebbene la riprogrammazione cellulare sia stata ampiamente sperimentata sulle cellule umane, l'applicazione di queste tecniche per generare linee di iPSC negli animali da allevamento è ancora poco sviluppata. Saranno necessari ulteriori studi per perfezionare i protocolli di riprogrammazione per diverse specie animali. Allo stesso tempo, le ESC risultano difficili da ottenere, principalmente a causa della breve finestra temporale in cui le blastocisti sono disponibili per il prelievo.

Un ostacolo esistente all'utilizzo di fonti di cellule pluripotenti per la produzione di carne coltivata è la mancanza di protocolli di differenziazione consolidati per ottenere tipi di cellule progenitrici e mature rilevanti. Sebbene esistano protocolli consolidati per ottenere miociti scheletrici (Jiwlawat et al., 2017) (Jiwlawat et al., 2018), cellule satellite, (Al Tanoury et al., 2020) MSC/FAP (Hynes Et al., 2014) e adipociti (Guènantin et al., 2017) da cellule staminali pluripotenti umane e di topo, questi protocolli potrebbero richiedere un adattamento per essere efficaci con altri specie animali.

2.4 Cellule staminali adulte contro cellule staminali pluripotenti

Per ottenere una produzione di successo di carne coltivata, un compromesso considerevole è come bilanciare la facilità e il costo di ottenere un tipo cellulare con la capacità proliferativa e il potenziale del tipo cellulare. Le cellule staminali pluripotenti sono spesso più complicate da coltivare ed è più costoso ottenere le cellule progenitrici per la produzione di carne coltivata da cellule pluripotenti che da cellule staminali adulte primarie. Le cellule staminali pluripotenti richiedono inoltre più tempo e risorse per differenziarsi in tipi cellulari maturi rispetto alle cellule staminali adulte primarie poiché si trovano in una fase di sviluppo precedente. Tuttavia, le cellule staminali pluripotenti possiedono un potenziale proliferativo maggiore e sono immortali, il che significa che possono proliferare indefinitamente. Al contrario, le cellule staminali adulte primarie offrono il vantaggio di essere facilmente ottenute da una biopsia da qualsiasi specie o muscolo di interesse per produrre una popolazione cellulare per qualsiasi prodotto a base di carne desiderato, ma hanno una capacità proliferativa limitata (Ding., 2019). La creazione di linee di cellule staminali pluripotenti da specie animali ha visto progressi negli ultimi anni, ma non è stata stabilita nella scala necessaria per fornire la quantità e la riduzione

dei costi necessari per la produzione di carne coltivata (Vilarino et al., 2020) (Gao et al., 2014) (Bogliotti et al., 2018).

Anche il miglioramento della capacità proliferativa delle cellule staminali adulte ha ricevuto attenzione, più comunemente inibendo le proteine coinvolte nella differenziazione o utilizzando nuove tecniche di ingegneria genetica per colpire i geni coinvolti nella differenziazione (Hu et al., 2017) (Robin et al., 2015).

Un altro aspetto fondamentale nella produzione di carne coltivata, oltre alla capacità di proliferazione delle cellule selezionate, è l'efficienza con cui queste cellule si differenziano nei tipi cellulari maturi desiderati, garantendo un'elevata selettività e resa. Per quanto riguarda la scalabilità delle fonti cellulari, è importante considerare anche il livello di struttura richiesto nel prodotto finale. La carne non strutturata, come quella macinata, è più facile da produrre su larga scala e con costi più contenuti nel breve termine rispetto ai tagli di carne strutturata. Questo potrebbe portare a un focus iniziale sull'ottimizzazione delle cellule per la crescita e la resa, piuttosto che sulla morfologia complessa o sulla formazione di tessuti.

Oltre alla creazione di linee di cellule staminali pluripotenti derivate da specie di bestiame rilevanti, anche l'ottimizzazione dei protocolli di coltura costituirà un obiettivo importante per raggiungere un'efficienza sufficiente della differenziazione cellulare e per ridimensionare il flusso di lavoro di produzione. Ciò può essere ottenuto identificando nutrienti e piccole molecole da includere nel mezzo di coltura cellulare, ottimizzando le condizioni di coltura legate alla nicchia cellulare e al microambiente, o sviluppando approcci di ingegneria genetica per controllare i geni che vengono espressi in modo differenziale durante la differenziazione (Ahfeldt et al., 2012).

2.5 Fattori di crescita

Uno degli step più impegnativi nella produzione della carne in vitro è la giusta formulazione del mezzo di coltura. Un valido mezzo di coltura dovrebbe sostenere e promuovere la crescita, essere a buon mercato, essere composto da materiali edibili disponibili in grande quantità. Questi elementi sono essenziali per sostenere la proliferazione delle cellule e indirizzarne la differenziazione; quindi, devono essere attentamente considerati nello sviluppo delle fonti cellulari. Dal punto di vista dell'approvvigionamento cellulare, è fondamentale che le formulazioni dei terreni di coltura siano progettate per supportare la crescita di cellule staminali e la loro differenziazione in muscolo, grasso e tessuto connettivo maturo.

La struttura generale delle formulazioni dei terreni di coltura rimane abbastanza omogenea tra specie e tipi di cellule. Per le cellule staminali adulte, come le cellule satellite e le MSC/FAP,

questa struttura comprende comunemente una formulazione di terreno basale, come il terreno Eagle modificato di Dulbecco (DMEM)/F12, L-glutammina, aminoacidi non essenziali e una bassa concentrazione di fattore di crescita dei fibroblasti-2 (FGF-2) (Chen G, 2011). Quando si coltivano cellule staminali pluripotenti, la formulazione del terreno è spesso simile ma può includere anche fattori di crescita aggiuntivi come FGF-2, fattore di crescita epidermico (EGF), fattore di crescita trasformante β (TGF- β), eparina, siero o un sostituto del siero, e componenti della matrice extracellulare (Mimura et al., 2011) (Das et al., 2009).

Questi componenti aggiuntivi del terreno possono anche essere inclusi nel terreno per le cellule staminali adulte per migliorare la crescita o dirigere il comportamento cellulare. Dunque, creare un cocktail ottimale di ormoni e fattori di crescita è un'impresa complessa, che richiede una grande quantità di indagini sperimentali. La selezione di fattori regolatori deve essere specifica per il tipo di cellula scelto e per la specie, come ad esempio è stato osservato che cellule miosatelliti di diverse specie rispondono in modo differente agli stessi fattori regolatori (Burton et al., 2000).

È inoltre probabile che la formulazione possa dover essere cambiata nel corso del processo di coltura; ad esempio, il periodo di proliferazione potrebbe richiedere una determinata combinazione di fattori di crescita e ormoni mentre la differenziazione e il periodo di maturazione potrebbero richiedere un mix diverso. Il siero animale, in particolare il siero bovino fetale (FBS), è stato utilizzato come supplemento di terreno comune per un'ampia gamma di approcci di coltura cellulare. FBS è un integratore di coltura desiderabile perché contiene una varietà di fattori di crescita, nutrienti, proteine, elementi in tracce, vitamine e ormoni. Queste molecole sono fondamentali per la crescita e il mantenimento delle cellule in vivo e in coltura (<https://www.sigmaaldrich.com/IT/it/products/cell-culture-and-analysis/cell-culture-supplements-and-reagents/fbs>). Il siero fetale bovino (FBS) è il supplemento per la crescita più utilizzato per i terreni di coltura cellulare per via dei livelli elevati di fattori che promuovono la crescita embrionale. Se utilizzato a concentrazioni adeguate, fornisce numerosi elementi definiti e indefiniti che si sono rivelati in grado di soddisfare gli specifici bisogni metabolici delle cellule in coltura.

Inoltre, il siero può essere utilizzato per controllare il comportamento cellulare, poiché la sua rimozione dal mezzo di coltura viene spesso utilizzata per innescare la differenziazione terminale delle cellule progenitrici muscolari in miociti scheletrici maturi. L'uso di FBS introduce problemi come la variabilità da lotto a lotto nella produzione di siero e il rischio di utilizzare siero contaminato da virus o prioni (Park et al., 2013). Di conseguenza, è auspicabile sostituire l'FBS con integratori privi di siero o alternative sieriche chimicamente definite.

FBS è un sottoprodotto dell'industria delle carni e di quella lattiero-casearia; dunque, gli animali non vengono macellati appositamente per la sua produzione. Rimane, tuttavia, l'FBS è un componente di derivazione animale, il che rende il suo utilizzo contraddittorio rispetto alle motivazioni per lo sviluppo di carne coltivata che non si basa sull'allevamento estensivo del bestiame. Negli ultimi anni, lo sviluppo di formulazioni di terreni privi di siero come Essential 8™, TeSR™ e FBM™ ha consentito la rimozione del siero dalla coltura cellulare (Badenes et al., 2016) (Kolkmann et al., 2020) (Stout et al., 2021). Tuttavia, sono ancora necessari ulteriori progressi per creare formulazioni di terreni chimicamente definiti che siano costantemente efficaci quanto i terreni a base di siero nel promuovere la crescita cellulare, in particolare per le cellule animali del bestiame. Oltre alle alternative sieriche, per ragioni simili è preferibile l'uso di fattori di crescita espressi come proteine ricombinanti rispetto a fattori di crescita di origine animale (Kolkmann et al., 2020) (Zhang et al., 2016) (Miki & Takagi., 2014). Inoltre, se lo sviluppo di un appropriato terreno privo di siero animale e senza qualsiasi componente derivata da animali appare ideale, d'altro canto occorre anche valutare il potenziale allergenico di certe proteine di origine vegetale, che si configura come un altro fattore di rischio per il consumatore di carne sintetica (Datar & Betti., 2010).

Un altro ostacolo critico per lo scale-up è il costo degli integratori medi. Oltre ai vantaggi menzionati in precedenza, la coltura senza siero può anche essere utile per ridurre sostanzialmente il costo medio (FBS, ad esempio, costa in genere oltre 1.000 dollari al litro). Nel contesto di un terreno di coltura privo di xeno e chimicamente definito, i componenti più costosi del terreno di coltura sono i fattori di crescita (Specht., 2020).

Tra questi fattori di crescita, FGF-2 e TGF- β rappresentano le spese primarie, poiché entrambi sono componenti essenziali del mezzo ed entrambi costano nell'ordine di 150-200 dollari al litro a concentrazioni medie standard, costituendo insieme oltre il 90% dei costi medi totali. L'incremento della produzione potrebbe essere in grado di ridurre questi costi, anche se trovare approcci alternativi per integrare o sostituire questi fattori di crescita rimane ancora un modo per ridurre rapidamente il costo della produzione di carne coltivata. Ad esempio, sono stati esplorati diversi potenziali mimetici di questi fattori chiave di crescita che potrebbero possedere utilità nel sostituire o integrare FGF-2 e TGF- β nel terreno di coltura (Pérez et al., 2017) (Miura et al., 2019) (Zhang et al., 2005).

Uno degli esempi disponibili in commercio è il siero Ultrosor G. La composizione di questo siero artificiale consiste principalmente in fattori di crescita, fattori di adesione, proteine, vitamine, minerali e ormoni di derivazione animale e vegetale, che sono necessari per la crescita delle cellule (Duque et al., 2003); contiene inoltre solo un quinto delle proteine

presenti nel siero animale, ma la crescita e la maturazione del tessuto è più veloce di quella che si ottiene in cellule nel medium di FBS. Tuttavia, il problema principale è il suo costo elevato e i tanti fattori di crescita necessari per la proliferazione cellulare.

Inoltre, il riciclaggio del mezzo condizionato durante l'espansione del bioreattore è un altro metodo efficace per ottenere risparmi medi sui costi. Il terreno condizionato contiene anche metaboliti cellulari e proteine della matrice extracellulare, (Balbi et al., 2019) che sono fattori importanti nella segnalazione e comunicazione cellulare e aiutano nella proliferazione e differenziazione cellulare se utilizzati insieme al terreno fresco (Henningsen et al., 2010).

I trasportatori di ossigeno possono essere integrati al mezzo di coltura per mantenere alta la concentrazione di ossigeno in soluzione, simile a quella del sangue. Esistono due distinte varietà di trasportatori di ossigeno: le versioni modificate dell'emoglobina e quelle chimicamente inerti, tipo i perfluorochimici (PFC), prodotte artificialmente. (Lowe., 2006a)

Sebbene siano state sviluppate molte emoglobine modificate chimicamente, la loro origine bovina o umana le rende candidati improbabili per essere utilizzati. In alternativa, l'emoglobina umana è stata prodotta da piante geneticamente modificate (Dieryck et al., 1997) e da vari microrganismi (Zuckerman et al., 1998); eme-proteine e componenti sostitutivi del sangue usando *Escherichia coli*, *Pichia pastoris* e *Aspergillus niger* sono già stati prodotti ed utilizzati per la produzione di prodotti farmaceutici e additivi alimentari (Lowe., 2006b).

I perfluorochimici (PFC), che dissolvono grandi volumi di ossigeno, potrebbero svolgere la stessa funzione dell'emoglobina ma, per essere miscibili in condizioni acquose, devono essere emulsionati (Lowe., 2006a).

2.6 Tecniche in co-coltura

Le cellule coltivate in vitro solitamente proliferano e si differenziano usando una monocoltura, in quanto questa condizione assicura un ambiente facilmente regolato senza che si abbiano eventuali interferenze con altri tipi di cellule (Haagsman et al., 2009). I mioblasti che sono impiegati nella produzione di muscoli scheletrici generano livelli molto piccoli di matrice extracellulare (Langelaan et al., 2010). Alcuni dati scientifici suggeriscono però che la matrice extracellulare è importante per guidare in vivo la rigenerazione e la crescita ordinata all'interno del muscolo scheletrico e di altri tessuti (Haagsman et al., 2009). Pertanto, si sostiene da tempo la necessità di impiegare cellule aggiuntive, nei sistemi di coltivazione cellulare, per ottenere il muscolo desiderato. I fibroblasti esistenti nei muscoli sono principalmente responsabili della crescita della matrice extracellulare e potrebbero quindi essere un'aggiunta vantaggiosa alla procedura di coltura (Bhat & Bhat., 2011), poiché la matrice extracellulare è responsabile della

tessitura della carne (Haagsman et al., 2009). Ciò significa che la co-coltura di miotubi e fibroblasti, recentemente sperimentata anche da Pandurangan & Kim (2015), per produrre matrice extracellulare, potrebbe essere un metodo utile per migliorare la maturazione delle miofibre, soprattutto perché i fibroblasti in vitro hanno dimostrato di aumentare la velocità di formazione dei miotubi (Haagsman et al., 2009), creando contemporaneamente una struttura più simile alla carne (Langelaan et al., 2010), sebbene le co-culture di mioblasti cresciute insieme ai fibroblasti includano il rischio di fibroblasti che superano i mioblasti, a causa di discrepanze nelle velocità di crescita tra i due tipi di cellule (Bhat & Bhat., 2011).

Tale co-coltura si è però dimostrata efficace nell'ingegneria del muscolo scheletrico in vitro quando i fibroblasti sono seminati in piccola percentuale rispetto alla popolazione cellulare totale (Haagsman et al., 2009).

Anche altri tipi di co-coltura sono stati studiati per capire le interazioni tra i diversi tipi di cellule come quella con adipociti e epatociti. Gli epatociti co-coltivati possono produrre fattori di crescita simili all'insulina che promuovono la proliferazione e la differenziazione dei mioblasti e anche delle cellule miosatellite (Cen et al., 2008); inoltre con la co-coltura gli adipociti potrebbero migliorare la qualità della carne determinandone un aumento del contenuto di grassi (Bhat & Bhat., 2011).

2.7 Ruolo dei bioreattori

I bioreattori sono definiti dei “dispositivi in cui i processi biologici e/o biochimici si sviluppano in un ambiente e in condizioni operative altamente monitorate e controllate.” (Asnaghi et al., 2009).

In pratica, un bioreattore fornisce un ambiente controllato e riproducibile, mantenendo temperatura, pH e livello di ossigeno controllati nella camera di coltura, ovvero crea un ambiente ideale per sostenere la crescita e lo sviluppo delle cellule al suo interno (Carrier et al., 2002).

Inoltre, facilita la diffusione dei nutrienti e promuove lo sviluppo cellulare attraverso agitazioni o stimolazioni meccaniche, favorendo la proliferazione e la maturazione delle cellule. Anche un'adeguata perfusione di ossigeno è mediata dai bioreattori che aumentano il trasporto di massa tra mezzo di coltura e cellule, assieme all'uso di trasportatori di ossigeno che imitano il ruolo dell'emoglobina nel sangue (Datar & Betti., 2010).

Avere una irrorazione adeguata del tessuto in coltura è una prerogativa essenziale nel processo di produzione della carne in vitro. Nelle prime fasi del processo, quando la priorità è la rapida espansione delle cellule, il bioreattore è essenziale per consentire una coltivazione su larga

scala, ottimizzando al contempo il ricambio e la gestione del terreno di coltura durante la fase di crescita. Attualmente, esistono tre tipi principali di bioreattore classificati in base alla modalità di introduzione del mezzo nel recipiente principale del bioreattore: batch, fed-batch e continuo (Spier et al., 2011).

Un bioreattore batch contiene un volume fisso di mezzo e funziona facendo crescere le cellule fino alla loro densità massima, quindi rimuovendo le cellule per l'uso o il trasferimento in un altro bioreattore con un vaso di dimensioni maggiori (Liu., 2017).

Un bioreattore fed-batch, a volte indicato anche come bioreattore semi-continuo, contiene un canale di ingresso per alimentare il mezzo fresco alle cellule su scale temporali prestabilite selezionate per massimizzare la proliferazione. Un bioreattore fed-batch è inoltre caratterizzato da un volume crescente nel tempo, poiché non possiede un canale di uscita per rimuovere il mezzo condizionato e i prodotti cellulari che si accumulano durante la coltura (Yamanè & Shimizu., 2005). Ciò differenzia i bioreattori fed-batch dalla classe principale finale di bioreattori, i bioreattori continui.

Nella coltura continua nel bioreattore, il mezzo fresco viene aggiunto al recipiente principale a una portata ottimizzata mentre il mezzo condizionato e i prodotti cellulari vengono rimossi contemporaneamente (Lindskog., 2018). Una coltura continua promuove al meglio una crescita equilibrata mantenendo i nutrienti, il numero di cellule e la biomassa a livelli relativamente costanti.

Un ultimo tipo di bioreattore, che è un sottoinsieme di bioreattori continui, è il bioreattore a perfusione. I bioreattori a perfusione funzionano fornendo un flusso medio a monte che trattiene le cellule all'interno del recipiente del bioreattore rimuovendo contemporaneamente i prodotti di scarto cellulare e il mezzo condizionato, il che aiuta a massimizzare il volume del recipiente e il riciclaggio del mezzo. Questo tipo di bioreattore può anche essere imitato sostituendo regolarmente il terreno di coltura nel bioreattore in punti temporali discreti senza raccogliere cellule, che ha dimostrato di essere un metodo promettente per la produzione di carne coltivata (Hanga et al., 2020).

Per applicazioni su larga scala, come la produzione di carne coltivata, sono generalmente preferiti l'introduzione in batch o in continuo del mezzo in quanto i reattori basati su questi meccanismi supportano meglio grandi volumi, possono essere automatizzati più facilmente e consentono il riciclaggio del mezzo condizionato (Allan et al., 2019).

Oltre alla classificazione in base all'introduzione e alla rimozione del mezzo, i bioreattori possono essere classificati anche in base al modo in cui ottengono la miscelazione dei contenuti che contengono. La miscelazione è incorporata nel sistema del bioreattore per agitare

il contenuto del bioreattore e favorire la crescita e lo sviluppo delle cellule. I bioreattori meccanici ottengono la miscelazione utilizzando mezzi meccanici come agitatori o giranti. Questi bioreattori sono i bioreattori più comunemente utilizzati per lo sviluppo di bioprocessi. I più notevoli tra i bioreattori meccanici sono i bioreattori a serbatoio agitato, che utilizzano una girante per agitare il contenuto del bioreattore per creare un flusso convettivo e favorire la circolazione e la diffusione dei nutrienti nel recipiente. I bioreattori con serbatoio agitato sono stati il tipo di bioreattore più frequentemente utilizzato per lo scale-up dei bioprocessi (Martin et al., 2004). Dato che i sistemi con vasche agitate sono ben consolidati e hanno dimostrato di essere altamente scalabili, rappresentano forse il tipo di bioreattore più promettente per l'incremento della produzione di carne coltivata. Tuttavia, i sistemi con matracci rotanti possono generare un flusso turbolento che non favorisce la proliferazione cellulare e l'elica può danneggiare le cellule quando entra in contatto diretto con esse.

Un altro bioreattore meccanico comunemente usato è un bioreattore con vaso a pareti rotanti, che fa ruotare il vaso principale del bioreattore attorno al suo asse centrale per coltivare dinamicamente il contenuto del vaso in sospensione (Radtke & Herbst-Kralovetz., 2012). I sistemi di vasi a pareti rotanti possiedono il vantaggio di creare uno stress di taglio minimo e possono consentire alle cellule di formare aggregati tridimensionali (3D). Tuttavia, alcuni tipi di cellule dimostrano un aumento dei tassi di apoptosi nelle prime fasi della coltura (Hammond T.G. & Hammond J.M., 2001). I sistemi con vasi a pareti rotanti generalmente utilizzano la coltura batch, ma è possibile aggiungere la perfusione per rendere il sistema più automatizzato. Un ultimo tipo comune di bioreattore meccanico è un sistema bioreattore meccanicamente attivo. Questo bioreattore incorpora una forza meccanica controllata, come la compressione dinamica, sulle cellule o sulle impalcature dei tessuti. Questa stimolazione aiuta lo sviluppo cellulare imitando l'ambiente di sviluppo nativo e può rafforzare e allineare le cellule o la struttura dell'impalcatura (Meinert et al., 2017). Questo tipo di agitazione può essere favorevole per la produzione di carne coltivata poiché l'allineamento e la resistenza meccanica sono caratteristiche importanti delle miofibre.

Per l'espansione delle cellule muscolari scheletriche, in diversi studi è stato utilizzato un bioreattore a fibra cava (Bettahalli N. et al., 2011) (Bettahalli N.M.S. et al., 2011) (Yamamoto et al., 2012) (Baba & Sankai., 2017). I bioreattori a fibra cava sono classificati come bioreattori idraulici, il che significa che la miscelazione viene ottenuta tramite flusso di liquido anziché tramite miscelazione meccanica. Ciò comporta la semina delle cellule in una matrice con fibre cave porose per consentire alle cellule di aderire alla superficie della fibra cava dove può circolare anche il mezzo. Un sistema a fibra cava offre i vantaggi di creare un basso stress di

taglio, una maggiore selezione dei nutrienti trasportati ed è ideale per i tipi di cellule altamente metaboliche. Tuttavia, i bioreattori a fibra cava sono per lo più limitati alla coltura cellulare e non supportano molto bene la coltura di scaffold tissutali.

Da un punto di vista cellulare, diversi fattori dovrebbero essere considerati quando si crea un sistema bioreattore per la produzione di carne coltivata. Se venisse utilizzata una fonte cellulare primaria, il bioreattore potrebbe dover contenere una superficie su cui le cellule possano aderire o supportare la coltura di cellule aderite a scaffold. Questo perché diversi tipi di cellule presenti nella carne, compresi i miociti (LaBarge & Blau., 2013), dipendono dall'ancoraggio e devono aderire a una superficie per proliferare e differenziarsi correttamente. Potrebbe essere fattibile espandere la fonte cellulare iniziale fino a grandi quantità in sospensione prima che vengano differenziate in tipi cellulari specifici che richiedono l'ancoraggio. In alternativa, possono essere desiderabili approcci colturali che utilizzano aggregati sferici non aderenti e fluttuanti per eludere la potenziale necessità di un substrato durante l'espansione del bioreattore (Hosoyama et al., 2014). Questo approccio culturale sarebbe più rilevante per le fonti di cellule staminali pluripotenti, che possono essere coltivate come aggregati fluttuanti. Al contrario, altre fonti di cellule staminali adulte, come le cellule staminali mesenchimali e le cellule satelliti muscolari, richiederanno un substrato di attacco. Questo approccio introduce anche la preoccupazione della formazione di nuclei necrotici se gli aggregati diventano troppo grandi per consentire la diffusione di nutrienti e ossigeno e richiede la dissociazione cellulare alla fine della coltura. Un'altra considerazione è la capacità del bioreattore di supportare la co-coltura di più tipi di cellule per la produzione di carne coltivata, come cellule muscolari e adipose.

Studi precedenti hanno dimostrato che gli approcci di co-coltura del bioreattore sono possibili utilizzando diversi tipi di cellule rilevanti, tra cui mioblasti scheletrici (Cerino et al., 2016), muscoli lisci (Williams & Wick., 2005) e MSC (Rebelo et al., 2015). Tuttavia, questi studi hanno utilizzato cellule murine o umane e l'ottimizzazione per i tipi di cellule del bestiame è probabilmente necessaria per tradurre gli approcci del bioreattore di co-coltura per la produzione di carne coltivata. I bioreattori a perfusione, che combinano l'introduzione continua del mezzo con un flusso di perfusione mirato, sono visti da molti come un approccio promettente per la creazione di prodotti a base di carne coltivata di dimensioni specifiche (Datar & Betti., 2010) (Specht et al., 2018). Questo perché la portata del flusso di perfusione in questi bioreattori può essere adattata per adattarsi alla struttura e alle dimensioni del tessuto coltivato. Tuttavia, poiché la portata del flusso di perfusione aumenta linearmente con la scala e le dimensioni dell'impalcatura, lo stress di taglio aumenterà e la pressione diminuirà, il che

potrebbe portare alla morte cellulare. Quanto detto sopra rappresenta una sfida tecnica che deve essere considerata attentamente, che potrebbe essere mitigata implementando funzionalità aggiuntive del bioreattore. È possibile che alcuni sistemi di bioreattori possano essere ottimali per la produzione di un tipo di prodotto a base di carne coltivata, ma questi sistemi potrebbero non essere adatti per altre forme e dimensioni di carne. La continua ottimizzazione dei sistemi di bioreattori per la produzione su larga scala sarà necessaria man mano che l'industria cresce e mira a soddisfare una vasta gamma di prodotti a base di carne coltivata.

2.7.1 Stimoli elettrici

L'applicazione di stimoli elettrici durante la coltura della carne in vitro è importante per lo sviluppo di fibre muscolari mature (Bach et al., 2004) (Wilson & Harris, 1993) in quanto stimola l'attività di contrazione che migliora la differenziazione del miotubo verso differenti forme di catene della miosina per lo sviluppo ottimale del sarcomero (Fujita et al., 2007) (Naumann & Pette, 1994). La stimolazione elettrica è quindi utile nel controllo accurato della funzione muscolare di cellule ingegnerizzate (Dennis et al., 2009). A questo proposito, è stato dimostrato che l'induzione di attività contrattile ha promosso la differenziazione di miotubi in coltura attraverso l'espressione di diverse isoforme della catena pesante della miosina e lo sviluppo di sarcomeri (Fujita et al., 2007) (Naumann & Pette, 1994). Inoltre, è stato osservato che la stimolazione elettrica precoce accelera la maturazione dei miotubi rispetto allo sviluppo del sarcomero nella linea cellulare murina myoblast C2C12 (Langelaan et al., 2010). Entro un periodo di differenziazione relativamente breve di 5 giorni, nelle colture elettricamente stimulate le striature incrociate mature si erano sviluppate, mentre le colture di controllo non stimulate non mostravano strisce trasversali (Langelaan et al., 2010). Questo effetto era associato a livelli di espressione sovra-regolati della proteina LIM del muscolo che induce alla maturazione muscolare, e dei componenti della catena pesante della miosina sarcomerica perinatale, actina e α -actina (Langelaan et al., 2010). La stimolazione elettrica può anche rappresentare uno strumento non invasivo ed accurato per valutare la funzionalità dei costrutti muscolari ingegnerizzati (Dennis et al., 2009). Generando un campo elettrico omogeneo all'interno del bioreattore, i costrutti funzionali del muscolo esercitano una forza dovuta alle contrazioni attive delle cellule muscolari.

2.8 Ruolo degli scaffold

In vivo le fibre muscolari si trovano in reti costituite da un'impalcatura di tessuto connettivo formata dai fibroblasti che guida lo sviluppo, l'organizzazione e l'orientamento delle cellule muscolari (Grounds et al., 2002). Per questo motivo per la produzione in vitro sono necessari supporti chiamati scaffold, cioè del materiale poroso, su cui le cellule ancorate possono rimanere vitali e proliferare (Enrione et al., 2017).

Gli scaffold sono quindi delle strutture tridimensionali naturali o artificiali sulle quali vengono inizialmente seminate e successivamente fatte crescere le cellule al fine di generare un costrutto biologico funzionale; essi definiscono un vero e proprio spazio tridimensionale, guidando lo sviluppo del tessuto per poi biodegradarsi progressivamente.

Considerando le fonti cellulari per la carne coltivata, i contributi chiave degli scaffold consistono nel consentire la differenziazione delle cellule staminali/progenitrici tramite l'ancoraggio e nell'influenzare la forma e la disposizione cellulare del prodotto finale. Poiché il prodotto finale è commestibile, anche le impalcature in tessuto per la produzione di carne coltivata devono essere biodegradabili e non tossiche. In alternativa, l'impalcatura potrebbe essere progettata per degradarsi o essere rimossa prima del consumo.

I metodi per produrre carne in vitro comunemente prevedono la crescita di mioblasti capaci di contrazione spontanea su uno scaffold sospeso in un mezzo di coltura all'interno di un bioreattore (Datar & Betti., 2010). Dal momento che lo scaffold deve rimpiazzare la matrice extracellulare naturale, dovrà anche influire correttamente sulle proprietà biomeccaniche, biochimiche e biologiche del tessuto e delle sue cellule.

In particolare, lo scaffold dovrà soddisfare i seguenti requisiti:

- possedere un grado di porosità tale che gli interstizi (o pori) abbiano un'adeguata dimensione e costituiscano un reticolo percolativo che favorisca la crescita, la disposizione delle cellule, l'apporto di sostanze nutritive e lo smaltimento dei prodotti metabolici (Hutmacher., 2000);
- le fibre che costituiscono lo scaffold dovranno essere biocompatibili, non tossiche e biorisorbibili, con una velocità di riassorbimento e degradazione compatibile con quella di formazione del nuovo tessuto (Hutmacher., 2000), in modo tale che al termine del processo di sintesi il tessuto sia costituito unicamente da materiale biologico;
- fornire un'ampia superficie, essere flessibile in modo da consentire la contrazione, massimizzare la diffusione di ossigeno e nutrienti, essere edibile o facilmente eliminato una volta terminato il processo di coltura (Tripathi et al., 2012).

La ricerca in campo tecnologico ha come obiettivo lo sviluppo di scaffold edibili che non debbano essere rimossi dalla carne e che non contengano materiali provenienti da animali.

Gli scaffold possono essere di due tipologie: designer e random scaffold. I designer scaffold possono essere idrogel biocompatibili, come ad esempio gel di fibrina misto con collagene e Matrigel o gel di agarosio; oppure polimeri sintetici biodegradabili, come ad esempio il policaprolattone (PCL) o il polilattato (PLLA) prodotti con la tecnica di elettrospinning o filatura elettrostatica che consente di ottenere filamenti continui di diametro piccolissimo, inferiore al micron (Antonuccio et al., 2017).

I random scaffold prevedono invece l'uso di tessuto animale decellularizzato (Fig. 4) per produrre strutture meglio organizzate e di dimensioni rilevanti (Antonuccio et al., 2017). La decellularizzazione è una tecnica che consente di eliminare tutte le cellule dal tessuto che si vuole utilizzare come scaffold senza alterare la struttura biologica e meccanica della matrice extracellulare, attraverso delle manipolazioni che sfruttano processi fisici, chimici o enzimatici, mantenendo l'architettura del tessuto nativo e preservando sia la matrice extracellulare che tutte le componenti biologiche. Inoltre, durante il processo di decellularizzazione, è fondamentale mantenere l'integrità della rete vascolare del tessuto poiché le soluzioni di lavaggio impiegate sfruttano proprio la rete sanguigna raggiungendo tutti i punti del tessuto (Marotta., 2013).

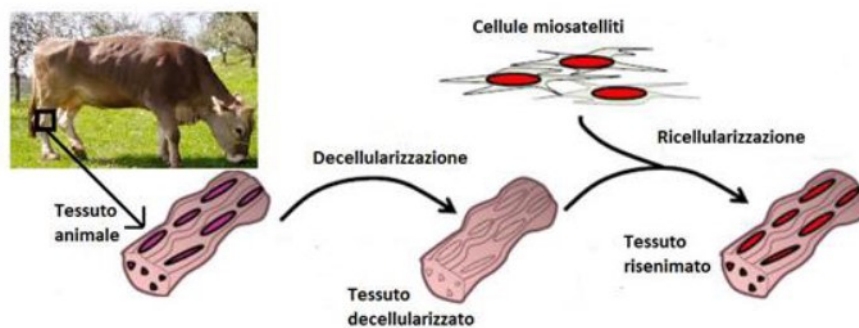


Figura 4: Random scaffold da tessuto muscolare decellularizzato (fonte: Antonuccio et al., 2017)

Altra sfida per quanto riguarda l'utilizzo degli scaffold è quella della rimozione del sistema di impalcature dalla carne (Datar & Betti., 2010).

Gli scaffold sono convenzionalmente rimossi meccanicamente o enzimaticamente, ma questi due metodi possono danneggiare le cellule o la matrice extracellulare (Canavan et al., 2005). Dato che i mioblasti sono cellule dipendenti dall'ancoraggio, il che significa che è necessaria un sostegno durante il loro sviluppo, capiamo che di conseguenza, è necessaria un'impalcatura

durante la fase di differenziazione nel flusso di lavoro della carne coltivata. Un tipo di impalcatura frequentemente utilizzato sono i microcarrier, che sono strutture sferiche su microscala che possono essere create da biomateriali naturali o sintetici (Li et al., 2015).

Il biomateriale per questi microcarrier può essere costituito da componenti della matrice extracellulare o da mimetici di questi componenti che consentono alle cellule di aderire ai microcarrier (Dias et al., 2017). L'ampio rapporto superficie-volume posseduto dai microcarrier aiuta significativamente ad aumentare il numero di cellule poiché consente ad una grande densità di cellule di aderire al microcarrier (Verbruggen et al., 2017).

Tuttavia, il distacco delle cellule dal microcarrier è una sfida esistente che può ridurre la resa di cellule e tessuti disponibili a causa di un distacco inefficiente o della morte cellulare (Caruso et al., 2014).

I microcarrier possono anche essere incorporati nel prodotto a base di carne coltivata, il che può consentire di adattare la composizione e le proprietà dei microcarrier per migliorarne gusto, colore e consistenza (Bodiou et al., 2020).

La maggior parte dei prodotti a base di carne coltivata presentati finora, come carne macinata, polpette e crocchette di carne, non possiedono un'architettura di impalcatura prominente. Ciò potrebbe riflettere la difficoltà di creare un'impalcatura commestibile, che supporti la vitalità cellulare durante la differenziazione e consenta un'organizzazione cellulare 3D definita nel prodotto finale. Dunque, è necessario un ulteriore sviluppo della tecnologia degli scaffold per creare scaffold che soddisfino tutte queste considerazioni in parallelo. Ciò richiederà l'adattamento dei biomateriali e delle tecnologie delle impalcature esistenti per la produzione di carne coltivata o lo sviluppo di nuove opzioni.

Si stanno esplorando anche nuovi tipi di biomateriali per la produzione di carne coltivata. Ad esempio, gli scaffold a base vegetale, che contengono biomolecole endogene che contribuiscono al microambiente cellulare, nonché una struttura biodegradabile intrinseca, sono uno di questi nuovi biomateriali in fase di studio (Ben-Arye et al., 2020) (Gershlak et al., 2017) (Fontana et al., 2017).

2.8.1 Scaffold in idrogel

L'uso di scaffold tradizionali (ad es. Matrigel) permette di produrre carne dalla consistenza morbida che può essere usata per preparare hamburger, salsicce, ecc. (Sharma et al., 2015). Lo svantaggio principale associato a tale tecnica è che non si può produrre carne altamente strutturata o tridimensionale come, ad esempio, le bistecche.

Mentre gli scaffold in idrogel (Fig. 5) hanno dimostrato un grande potenziale per varie applicazioni di ingegneria tissutale grazie alla loro capacità di incapsulare le cellule all'interno

di microambienti tridimensionali simili all'ambiente fisiologico. Gli studi condotti presso l'Università della California, Riverside, hanno permesso di depositare nel 2018 il brevetto relativo ad uno scaffold idrogel per la coltura cellulare tridimensionale che è stato reso pubblico nel 2019 (<https://techtransfer.universityofcalifornia.edu/NCD/29018.html>).

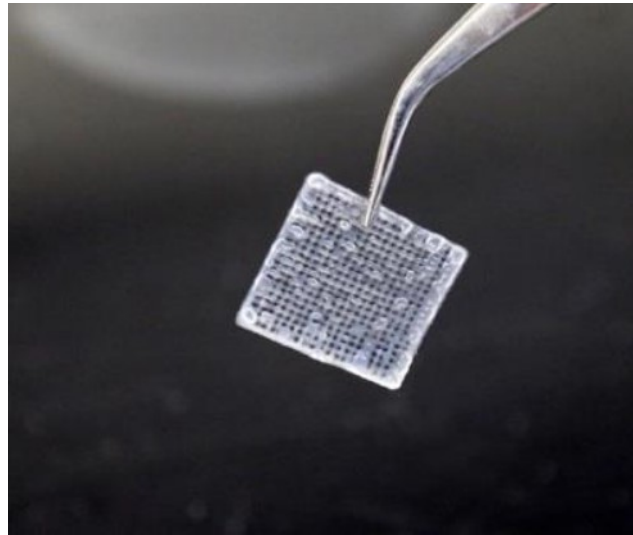


Figura 5: Esempio di scaffold in idrogel 3D

(fonte: <https://www.flickr.com/photos/envisiontec/40447763650>)

Molti tipi diversi di idrogel sono stati sviluppati attraverso la modificazione chimica e la funzionalizzazione per dirigere i comportamenti delle cellule staminali verso un maggiore sviluppo di specifici tessuti, come l'angiogenesi, la neurogenesi, la miogenesi, l'osteogenesi e l'adipogenesi. In particolare, diversi sistemi di idrogel hanno dimostrato un'eccellente capacità di migliorare la condrogenesi delle cellule staminali grazie alla loro nanostruttura fibrosa idratata, che fornisce un ambiente cellulare simile alla cartilagine nativa. Tuttavia, uno dei principali inconvenienti dell'utilizzo di scaffold in idrogel è la necessità di processi di sintesi multi-step per costrutti di cellula/scaffold con dimensioni definite, limitando il loro utilizzo immediato.

Per creare un idrogel che possa incapsulare le cellule, si dissolve un polimero precursore e lo si mescola con una soluzione contenente cellule. Poi, il tutto passa attraverso una fase di gelificazione in uno stampo per ottenere un idrogel con una forma definita. Sarebbe più pratico eliminare alcuni passaggi, come l'uso dello stampo, per rendere il processo più rapido. Un tipo di scaffold avanzato combina due materiali: un idrogel che risponde al calore e si dissolve rapidamente per riempire i pori e un polimero biodegradabile che dà struttura. Insieme, questi materiali offrono una maggiore robustezza meccanica e migliorano la crescita delle cellule. Questo sistema consente una facile applicazione delle cellule su strutture 3D senza necessità di stampi complicati. I materiali idrogel termosensibili, come quelli a base di chitosano o poli

(N-isopropilacrilammide), vengono utilizzati spesso in ingegneria tissutale perché rispondono a determinate temperature e sono biodegradabili, quindi non danneggiano l'organismo (Nam et al., 2019).

2.8.2 Auto-organizzazione

Un'altra alternativa alla tecnica scaffold è la tecnica di auto-organizzazione: le cellule possono essere coltivate in substrati che consentono lo sviluppo di "costrutti auto-organizzanti" che producono strutture piuttosto rigide. La tecnica di auto-organizzazione permette di produrre una struttura 3-D altamente realistica come la carne naturale. L'unico inconveniente associato a tale tecnica è che le cellule, trovandosi raggruppate, sono spesso separate dalle fonti di nutrimento da una distanza superiore a 0,5 mm e diventano pertanto necrotiche per mancanza di diffusione dei nutrienti (Bhat et al., 2015).

2.9 Biostampa

Recentemente, un altro approccio sta acquisendo importanza: la biofabbricazione, questo processo consente la produzione di costrutti carichi di cellule utilizzando materiali contenenti cellule miste e molecole biologiche. Il principale vantaggio è la possibilità di fabbricare strutture più spesse e di controllare la disposizione spaziale delle cellule, anche di più tipi, che sono i maggiori limiti dei metodi di scaffolding convenzionali (Moroni et al., 2018).

La biostampa 3D (3DBP) è una tecnologia di biofabbricazione che consente il posizionamento preciso delle cellule, la deposizione della densità e il controllo preciso della struttura e il rapporto tra diverse popolazioni in caso di costrutti multicellulari. Le miscele di materiale cellulare utilizzate nel processo sono chiamate bioinchiostri (Handral et al., 2020).

Data l'architettura unica e la diversa composizione cellulare dei diversi tagli di carne, la biostampa 3D è un'altra tecnologia promettente per creare impalcature per la produzione di carne coltivata. Le biostampanti 3D funzionano utilizzando un modello di progettazione assistita da computer, che istruisce la biostampante 3D dove depositare un determinato biomateriale, determinando la formazione di una struttura tissutale 3D uno strato alla volta (Fedorovich et al., 2011).

La composizione del bioinchiostro può essere adattata per contenere cellule e biomolecole oltre al biomateriale dell'impalcatura primaria, consentendo la fabbricazione dell'impalcatura biostampata nello stesso momento in cui vengono introdotte cellule e molecole di segnalazione. Il 3DBP rappresenta un possibile punto di svolta nel campo della produzione di carne in vitro, garantendo un'elevata scalabilità, un processo privo di complessità, un dispendio

energetico minimo e minori emissioni. I principali metodi di bioprinting sono basati su estrusione, getto d'inchiostro e metodi basati su laser e luce (Lanzoni et al., 2022).

Le biostampanti a getto d'inchiostro utilizzano un sistema termico o piezoelettrico per erogare bioinchiostro dai loro ugelli. Le biostampanti a getto d'inchiostro hanno il vantaggio di essere relativamente economiche e molto precise e utilizzano condizioni blande che difficilmente danneggiano le cellule (Saunders & Derby., 2014). Tuttavia, le biostampanti a getto d'inchiostro rilasciano bioinchiostro a bassa viscosità, il che compromette la qualità dell'impilamento 3D poiché la dimensione dello scaffold aumenta e di conseguenza può produrre uno scaffold meno resistente meccanicamente (Dababneh & Ozbolat., 2014).

Le biostampanti laser utilizzano un laser insieme a una lente ottica per stampare una gocciolina su scala microscopica (Keriquel et al., 2017). Le biostampanti laser possiedono il vantaggio di essere prive di ugelli, il che significa che è possibile stampare viscosità maggiori e possiedono anche una risoluzione più elevata rispetto ad altre modalità di biostampa. Al contrario, il laser utilizzato potrebbe danneggiare inavvertitamente le cellule e il sistema non è facile da ampliare.

L'ultimo tipo principale di biostampante 3D, le biostampanti a estrusione, sono azionate meccanicamente o pneumaticamente. Questo metodo di azione consente di utilizzare bioinchiostro ad altissima viscosità e si traduce in un'impalcatura con forti proprietà meccaniche. Tuttavia, il metodo di azione delle biostampanti a estrusione produce uno stress di taglio sulla punta dell'ugello, che limita i biomateriali che possono essere utilizzati nel bioinchiostro, e la risoluzione finale dello scaffold è la più bassa dei tre tipi di biostampanti.

L'azienda Modern Meadow, fondata da Gabor e Andras Forgacs in New Jersey, già produce carne in vitro utilizzando le attuali tecniche di bio-printing 3D (Antonuccio et al., 2017).

2.10 Ostacoli nel percorso

Attualmente le cellule utilizzate per la produzione della carne coltivata sono le cellule satellite (multipotenti e adulte), che rappresentano le cellule staminali proprie del muscolo responsabili della rigenerazione. Le cellule satellite sono difficili da isolare, poiché presenti in quantità minima nei tessuti maturi, e la loro proliferazione in coltura non è efficiente come quella delle ESC, seppure le cellule satellite replicano molto velocemente e per un numero molto elevato di cicli di duplicazione. La loro capacità proliferativa in vitro ha bisogno di essere migliorata per simulare i tassi di proliferazione in vivo e che sono necessari per la produzione di carne in vitro (Langelaan et al., 2010).

Altra problematica è la vascolarizzazione. Le tecniche di ingegneria tissutale attualmente permettono di produrre solo tessuti sottili poiché l'assenza di vasi sanguigni rende impossibile la creazione di strutture molto complesse in quanto le cellule vanno incontro a necrosi se sono separate per un lungo periodo di tempo da una fonte di nutrimento (Antonuccio et al., 2017). Nelle tecniche di ingegneria tissutale è fondamentale che le colture cellulari, seminate su substrati biorisorbibili dei quali devono essere note la cinetica di degradazione, le caratteristiche chimiche e meccaniche, le proprietà morfologiche, siano adeguatamente ossigenate e nutrite; non solo, i prodotti di scarto devono essere altrettanto opportunamente allontanati. È perciò evidente che i problemi di trasporto di massa assumano un ruolo cruciale nella crescita tissutale; a tali problemi la biologia ha saputo rispondere, ad esempio, attraverso la soluzione evolutiva dell'apparato circolatorio nel quale l'efficace apporto di ossigeno e nutrienti è garantito accoppiando il trasporto convettivo nei vasi e il trasporto diffusivo dai capillari alle cellule. Anche l'ingegneria tissutale cerca di avvalersi del trasporto combinato, lasciando le cellule esposte ad un flusso all'interno di bioreattori (Mantero et al., 2009).

Il dimensionamento dei bioreattori prende pertanto come riferimento ciò che avviene nei sistemi biologici e si stima, ad esempio, che l'ossigeno ceduto dal sangue all'intero organismo sia dell'ordine di $17 \text{ nmol/h}/10^6$ cellule (Mantero et al., 2009).

L'ossigeno, ad esempio, riesce a penetrare un tessuto vivente fino ad una distanza finita pari a circa $200 \mu\text{m}$. Questo limite vale per molte strutture biologiche come membrane, aggregati cellulari, tessuto micro-vascolarizzato (Mantero et al., 2009).

In vivo, le cellule beneficiano della prossimità dei capillari del sangue per la propria richiesta di trasferimento di massa; in molti tessuti, le cellule non distano più di $100 \mu\text{m}$ dai capillari limitrofi. Inoltre, il piccolo diametro dei capillari (tra 6 e $8 \mu\text{m}$) assicura un tempo di residenza del sangue nel tessuto abbastanza lungo da permettere la diffusione radiale di ossigeno e dei nutrienti (Martin & Vermette., 2005).

Per superare i limiti di spessore di $100\text{-}200 \mu\text{m}$ dei tessuti, sarà necessaria in futuro la progettazione di un sistema di irrorazione dei tessuti che possa replicare il sistema vascolare (Jain et al., 2005).

L'incorporazione di reti vascolari in aggiunta al sistema di co-cultura rappresenta una sfida importante per l'ingegneria tissutale e per la produzione della carne coltivata.

Inoltre, elevata preoccupazione è legata anche all'instabilità genetica delle cellule a causa dell'elevato numero di proliferazioni che si rendono necessarie per aumentare significativamente il numero di cellule (Hocquette., 2016).

In altre parole, è possibile che possano svilupparsi delle cellule cancerose senza essere chiaramente identificate. Queste cellule cancerose sono probabilmente innocue per il consumatore perché morte quando la carne è ingerita e, in ogni caso, vengono digerite nello stomaco ed è quindi improbabile che vengano incorporate vive. Tuttavia, questo è un tema delicato per i consumatori e questo fenomeno dovrebbe essere approfonditamente studiato per garantire la salubrità del prodotto, essenziale per ottenere le autorizzazioni ufficiali per immettere un prodotto sul mercato (Hocquette., 2016).

Altro aspetto critico è legato alla formulazione del mezzo di coltura ottimale per garantire un alto tasso di crescita delle cellule. Numerosi nutrienti (carboidrati, amminoacidi, lipidi, vitamine ...), fattori di crescita (TGF β , FGF, IGF) e ormoni (insulina, ormoni tiroidei e/o ormone della crescita) sono necessari per coltivare le cellule e permettere loro di proliferare e differenziarsi regolarmente (Hocquette., 2016).

Altra sfida importante è replicare il gusto della carne, che è il risultato di una complessa interazione tra proteine, carboidrati ed aromi della frazione lipidica. Quindi, per ottenere carne in vitro caratterizzata da maggiore gusto, le cellule adipose devono necessariamente essere introdotte nel processo di coltura cellulare (Hocquette., 2016).

Ottenere un prodotto con la stessa la composizione in vitamine (vitamina B12 in particolare) e altri micronutrienti che apportano benefici nutrizionali è un ulteriore traguardo da raggiungere al fine di ottenere un prodotto competitivo sul mercato (Hocquette., 2016).

Capitolo 3

IMPATTO AMBIENTALE

3.1 Influenza sull'impronta ecologica

La motivazione per creare un approvvigionamento alimentare di carne coltivata è la possibilità di eliminare molte delle preoccupazioni ambientali ed etiche che esistono durante il processo di produzione della carne convenzionale. È stato dimostrato che l'allevamento del bestiame rappresenta un notevole stress per l'ambiente ed è uno dei principali fattori che contribuiscono al cambiamento climatico (Campbell., 2017) (Scollan., 2011).

Negli ultimi tempi, il dibattito sulla carne coltivata si è spostato dai circoli accademici e scientifici verso l'arena pubblica e politica, delineando diverse correnti di pensiero. Una delle opinioni più diffuse riguarda l'impatto ambientale: i sostenitori di questa tecnologia sottolineano che la carne in vitro rappresenta un'alternativa sostenibile, in grado di produrre cibo in maniera più pulita, preservando l'ecosistema e proteggendo la biodiversità, a differenza degli allevamenti intensivi, che contribuiscono alla loro erosione.

Collegata a questo argomento è l'idea che la produzione di carne coltivata possa alleviare le condizioni spesso critiche in cui vengono allevati gli animali negli allevamenti intensivi, riducendo la sofferenza animale e migliorando il rispetto delle normative sul benessere animale, spesso disattese. I consumatori, in particolare quelli di paesi sviluppati, sono sempre più interessati a conoscere le condizioni di benessere in cui vengono mantenuti gli animali allevati con finalità produttiva (Latvala et al., 2012). Alcuni consumatori stanno persino mettendo in discussione non solo il trattamento del bestiame ma la giustificazione etica per l'impiego di qualsiasi animale nella produzione di alimenti destinati al consumo umano (Cronney et al., 2012). La carne artificiale fornisce un'alternativa valida a questo problema e quindi potrebbe essere preferita dai consumatori in quanto acquisterebbero dei prodotti che assomigliano in tutto e per tutto alla carne tradizionale (Richardson et al., 1994) ma che sono nel frattempo il risultato di processi rispettosi degli animali e dell'ambiente. Alcuni credono

che potrebbe persino essere una soluzione per i vegetariani che evitano la carne per motivi etici legati alla macellazione, offrendo loro proteine animali senza il sacrificio di animali.

Un'altra linea di argomentazione favorevole si concentra sulla gestione delle risorse. I sostenitori ritengono che la carne coltivata permetterà di migliorare la sicurezza alimentare globale, grazie a una produzione più efficiente e sostenibile, riducendo così lo sfruttamento delle risorse naturali.

Nonostante l'ottimismo degli operatori del settore, alcuni studi hanno messo in dubbio la sostenibilità delle tecnologie di coltivazione cellulare. L'allevamento tradizionale del bestiame produce gas serra, ma anche le macchine utilizzate per la coltivazione della carne lo fanno. Nel 2019, uno studio approfondito dell'Università di Oxford ha previsto che l'utilizzo di fonti energetiche non rinnovabili per produrre carne in bioreattori potrebbe avere, a lungo termine, un impatto peggiore rispetto alla carne di allevamento. Non considerando, inoltre, gli output indiretti che l'allevamento del bestiame produce, ossia letame e liquame utilizzabili per la fertilizzazione della terra coltivabile. Questo crea un'importantissima circolarità nel sistema allevamento-ambiente circostante che contrasta significativamente l'impatto ambientale dell'allevamento stesso, apportando nutrienti necessari alla crescita e allo sviluppo delle colture (<https://www.bioecogeo.com/cose-la-carne-sintetica/>).

In futuro, l'integrazione di energie rinnovabili nella produzione di carne sintetica potrebbe rappresentare una svolta cruciale per superare le preoccupazioni legate alla sostenibilità. Se i bioreattori e le altre tecnologie impiegate nella coltivazione cellulare fossero alimentati principalmente da fonti energetiche rinnovabili, il bilancio delle emissioni di gas serra potrebbe essere drasticamente ridotto. Inoltre, il miglioramento delle tecniche di produzione, insieme all'utilizzo di energie rinnovabili, potrebbe favorire la riduzione dei costi energetici. Questo, a sua volta, renderebbe la carne coltivata economicamente più accessibile, abbassando il prezzo per il consumatore finale e aumentando l'adozione di questa tecnologia su larga scala.

3.2 L'alternativa sostenibile alla produzione tradizionale

Secondo uno studio della FAO l'impatto della filiera produttiva zootecnica tradizionale, in termini di emissioni di gas serra, sarebbe pari a circa 7,1 giga tonnellate (Gt) di anidride carbonica equivalente (CO₂) /anno (Fig.6). Le principali fonti di emissione legate alle attività di tale settore sono rappresentate dalla produzione e lavorazione dei mangimi (45% del totale), dal processo digestivo del bestiame (39%) e dalla decomposizione del letame (10%); il resto (5-6%) è imputabile al trattamento e al trasporto dei prodotti animali (Coldiretti., 2013).

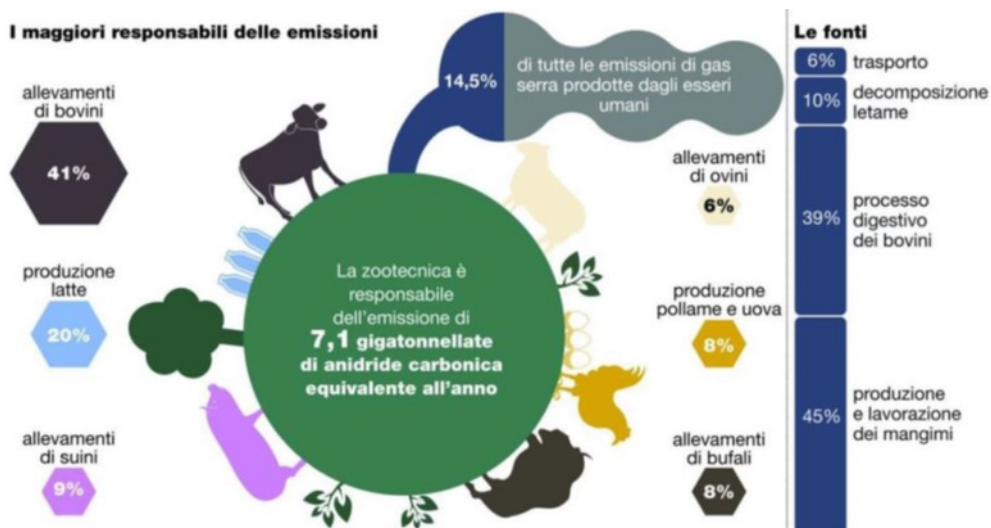


Figura 6: Gas serra prodotti dal settore zootecnico (fonte: Antonuccio et al., 2017)

Secondo le stime dell'ONU si prevede inoltre che nel 2050 la popolazione mondiale raggiungerà 9 miliardi di persone e tale rapido aumento della popolazione inciderà anche sulle emissioni annuali di CO₂ (liberata dalle emissioni di gas serra) con un aumento stimato da 11,2 a 19,7 Gt.

A causa di una popolazione mondiale in espansione e dell'aumentare del consumo di carne nei paesi con economie in via di sviluppo, è previsto che il consumo di carne raddoppierà nei prossimi quaranta anni (Fig. 7) (FAO., 2006).

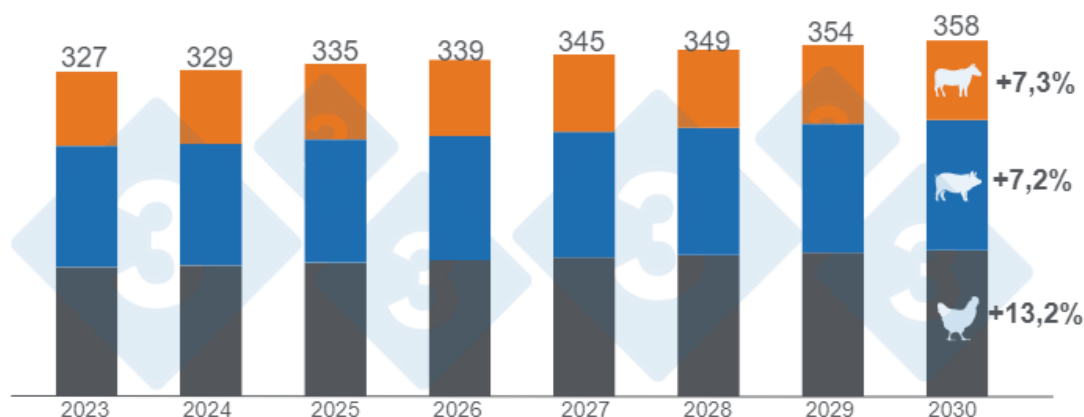


Figura 7: Crescita stimata del consumo globale di carne bovina, suina e pollo entro il 2030, cifre in milioni di tonnellate, variazioni 2023/2030. Preparato dal Dipartimento di Economia

e Market Intelligence di 333 LATAM con dati del Dipartimento dell'Agricoltura degli Stati Uniti (USDA).

Sebbene queste previsioni siano associate a notevole incertezza, la ricerca di un'alternativa sostenibile sembra necessaria. Stime dicono che la capacità del sistema di produzione di carne sia già vicina al suo massimo (FAO., 2006), di conseguenza, la carne diventerà scarsamente disponibile, e quindi più costosa finendo per diventare un cibo di lusso, con il rischio di aggravare la già diseguale distribuzione globale del cibo.

Inoltre, dal punto di vista del benessere animale, questo metodo elimina la necessità di allevare e macellare animali, affrontando le questioni etiche e morali associate all'allevamento industriale. Il prodotto, ottenuto in laboratorio promette di offrire benefici significativi, come una carne più sicura e nutriente per i consumatori, riducendo al contempo l'impatto ambientale.

Poiché gli animali ruminanti sono la principale fonte di emissioni di gas serra associate alla produzione di carne, qualsiasi diminuzione del numero totale di animali ruminanti allevati comporterebbe un miglioramento in termini di sostenibilità per l'ambiente. In questa ottica, i prodotti a base di carne artificiale potranno aiutare a ridurre le emissioni di gas serra rispetto al metodo di produzione della carne convenzionale; tuttavia, un'analisi completa del Life Cycle Assessment (LCA), che valuta l'insieme di interazioni che un prodotto o un servizio ha con l'ambiente e l'impatto ambientale (positivo o negativo) che scaturisce da tali interazioni, è necessaria per confermare tutto questo (Bonny et al., 2015).

Nel luglio 2011 è stata pubblicata un'analisi del ciclo di vita (LCA) comparando la carne coltivata con la carne prodotta in Europa in modo convenzionale (Tuomisto & de Mattos., 2011).

Questa analisi ha evidenziato che, in confronto all'allevamento tradizionale, la carne coltivata comporta un consumo energetico inferiore di circa il 7-45%, un decremento delle emissioni di gas serra del 78-96%, il 99% in meno di uso del suolo e l'82-96% in meno di acqua utilizzata a seconda della specie animale presa in considerazione (bovina, suina, pollame) (Tuomisto & de Mattos., 2011).

Steinfeld e collaboratori hanno stimato che il bestiame produca circa il 18% di emissioni globali di GHG antropogeniche (misurate in CO₂ equivalente) e richieda, per l'irrigazione di colture foraggere, circa l'8% del consumo umano di acqua (FAO., 2006). In uno scenario dove è previsto un aumento del consumo globale di carne, il passaggio dagli allevamenti tradizionali a favore della carne in vitro potrebbe servire a limitare gli aumenti netti di gas serra e uso di acqua (Bonny et al., 2015).

Una situazione simile esiste per l'uso del suolo. Steinfeld e collaboratori nello stesso report (FAO., 2006) hanno stimato che i pascoli e la produzione di materie prime per i mangimi zootecnici richiedono circa il 70% di tutti i terreni agricoli e il 30% della superficie emersa totale (Bonny et al., 2015).

Anche se una riduzione del 99% nell'uso del suolo sarebbe significativa, altri fattori potrebbero impedire la conversione di tali superfici in aree a basse emissioni di carbonio come le foreste. Quindi, anche se l'evoluzione verso la produzione di carne coltivata potrebbe portare a cambiamenti di uso del terreno, l'imboschimento o la riforestazione non sono garantiti (Mattick et al., 2015).

Il contributo del bestiame con le loro emissioni alla produzione dei tre principali gas serra: biossido di carbonio, metano e protossido di azoto- è stato indicato essere rispettivamente del 9%, 39% e 65% (FAO., 2006).

È stato però osservato che tali numeri variano notevolmente per paese e continente, e dipendono da molti fattori, inclusa la presenza o l'assenza di danni collaterali dovuti alla deforestazione (Post., 2012).

Un'altra motivazione alla ricerca di alternative all'allevamento del bestiame è la crescente preoccupazione dei consumatori verso le condizioni di benessere degli animali allevati. Il benessere degli animali può influenzare il comportamento del consumatore forzando così l'industria della carne a valutare continuamente le sue pratiche di allevamento (Post., 2012).

Capitolo 4

IL FUTURO DELLA CARNE SINTETICA

4.1 Sicurezza

Dati gli accurati controlli delle condizioni di coltivazione durante la produzione della carne in vitro viene limitata, o addirittura eliminata la sua possibile esposizione a prodotti pericolosi come pesticidi, fungicidi, metalli pesanti, aflatossine, melamina, agenti anabolici e antibiotici, un risultato difficile per i metodi di produzione di carne convenzionali (Marques et al., 2011). Agenti patogeni e malattie emergenti, come l'influenza aviaria e suina sono associati all'allevamento intensivo del bestiame (Greger., 2007). Mediante la produzione di carne coltivata sarà possibile eliminare le interazioni uomo-animale e animale-animale, frenando così l'incidenza delle zoonosi epidemiche in via di sviluppo (Datar & Betti., 2010). Inoltre, l'approccio che prevede l'abbattimento di tutti gli individui infetti sta diventando sempre più inaccettabile per un pubblico sempre più sensibile alle tematiche legate al benessere animale (Bonny et al., 2015).

Gli ambienti sterili per le colture cellulari e l'uso nei mezzi colturali di adeguati antimicrobici, potrebbero riuscire a rimuovere gli agenti patogeni come la Salmonella ed E. coli dal processo di produzione della carne (Datar & Betti., 2010) (Bonny et al., 2015). Tuttavia, gli ambienti sterili per le colture cellulari sono estremamente costosi, se non impossibili da realizzare su scala industriale; quindi, le colture richiederebbero un uso cronico e a lungo termine di antimicrobici che potrebbe anch'esso generare, nel lungo periodo, altri problemi di salute e di sicurezza alimentare. Inoltre, alcuni Autori sostengono che il processo della coltura cellulare non possa essere mai perfettamente controllato e che si potrebbero anche verificare dei meccanismi biologici inaspettati.

Un sistema di produzione della carne in vitro offre un livello di controllo del sistema produttivo che non può essere raggiunto con i tradizionali metodi di produzione della carne, ad esempio, potenziali pericoli per gli animali e difetti della carne a seguito di errori o impropri trattamenti durante le varie fasi di pre-macellazione (ad es. carni PSE -pale, soft, exudative- o le carni

DFD -dark, firm, dry) sarebbero evitati con la produzione di carne in vitro (Datar & Betti., 2010).

Oltre a ciò, le colture in vitro di tessuto muscolare possono eventualmente essere manipolate per creare intenzionalmente prodotti con caratteristiche qualitative differenti.

Il gruppo di ricerca tedesco Biozoon Food Innovation oltre a lavorare su una migliore digeribilità del prodotto finale, ha proposto nuovi sistemi di “texturing” per rendere il cibo stampato più “attraente”. Ad esempio, tramite un sistema inkjet è possibile stampare un filetto di pollo di qualsiasi forma e nella consistenza desiderata. Tale sistema permette già la personalizzazione del cibo mentre il gusto e l'aroma e l'aspetto visivo rimangono simili all'originale (Antonuccio et al., 2017).

4.2 Proprietà Nutrizionali

Con l'avvento di molti alimenti funzionali ed arricchiti, i consumatori sono oggi più disposti ad acquistare prodotti alimentari che sono stati modificati per avere particolari proprietà nutrizionali (Korhonen., 2002) (Burdock et al., 2006).

Mediante la co-coltura con la diversa formulazione dei media o mediante tecniche di ingegneria genetica, è in teoria possibile creare prodotti con gusti, trama e profili nutrizionali diversi. Inoltre, una delle più frequenti critiche mosse alla carne convenzionale è il suo alto contenuto di acidi grassi saturi che contribuiscono ad aumentare il rischio di contrarre malattie cardiovascolari. In vitro, il contenuto di grassi saturi è determinato dalla co-coltura delle cellule muscolari con adipociti; senza co-coltura, la coltura del miocita puro darebbe un prodotto con benefit nutrizionali interessanti, ricco in acidi grassi sotto forma di fosfolipidi. Inoltre, anche l'eventuale manipolazione genetica dei miociti potrebbe permettere modifiche nella composizione in acidi grassi del grasso prodotto che potrebbe essere arricchito in particolare di acidi grassi polinsaturi come gli omega-3 (Datar & Betti., 2010).

Oltre ad avere un alto contenuto proteico, caratterizzato da proteine che contengono tutta la gamma degli aminoacidi, la carne è una fonte esclusiva di diversi nutrienti essenziali. Alcuni nutrienti presenti nella carne tradizionale non sono però sintetizzati dalle cellule muscolari e dovranno pertanto essere integrati per ottenere un prodotto con lo stesso valore nutrizionale. Ad esempio, la vitamina B12 è sintetizzata esclusivamente da alcune specie di batteri che colonizzano l'apparato digerente di poligastrici e monogastrici e si trova quindi esclusivamente in prodotti alimentari di origine animale. Un supplemento di vitamina B12 sarebbe quindi necessario in un prodotto di carne coltivata in vitro in ambiente asettico (Datar & Betti., 2010).

Il ferro nella carne è presente come ione Fe^{2+} nella forma eme ad elevata biodisponibilità, nel gruppo prostetico che si trova nella mioglobina. In un sistema di coltivazione in vitro della carne, per fornire ferro in una forma biodisponibile compatibile con la crescita dei miociti, gli ioni Fe^{3+} legati alla transferrina dovranno essere integrati al mezzo di coltura. Il trasporto di ferro mediato da transferrina permetterà quindi al ferro di entrare nei mitocondri dei miociti ed essere incorporato nell'eme per la successiva sintesi della mioglobina (Aisen et al., 2001). I livelli di transferrina dovranno però essere strettamente monitorati per evitare la presenza di ioni Fe^{3+} liberi nel mezzo colturale poiché possono facilmente catalizzare la produzione di forme reattive dell'ossigeno dannose in ambienti aerobici (Papanikolaou & Pantopoulos., 2005).

Inoltre, Graber e Woodworth (1986) hanno osservato che i livelli di mioglobina non sono significativi in coltura fino a quando non si sia formata una popolazione stabile di miotubi, il che può aiutare a determinare il tempo di crescita ottimale necessario prima che il prodotto sia pronto.

Pertanto una grande sfida per la produzione di un prodotto di carne cresciuto in vitro competitivo sta nel garantire la presenza di tutti i nutrienti necessari. Minerali e vitamine, non sintetizzate dai miociti, richiederanno nel mezzo di coltura proteine leganti e meccanismi di trasporto efficaci per assicurare l'ingresso nelle cellule. La conoscenza del complesso metabolismo di ciascuna vitamina e minerale è quindi necessaria per sviluppare un prodotto a base di carne dall'elevato valore nutrizionale. La determinazione del corretto profilo nutrizionale della carne in vitro sarà una sfida importante da affrontare, che richiederà una profonda conoscenza di come manipolare il sistema di coltura per realizzare prodotti in vitro nutrizionalmente corretti e completi (Datar & Betti., 2010).

4.3 Sfida alla tradizione alimentare europea

La carne sintetica, pur nascendo e crescendo in un ambiente igienicamente controllato, è un alimento destinato ad essere iperprocessato per poter raggiungere gusti e aromi che la possano farla assomigliare a quella tradizionale. Per non parlare, per l'appunto, della specificità e della tradizionalità che le innumerevoli tipologie di carni conservano da decenni, se non da secoli. Ogni razza bovina, ovina, caprina, avicola, suinicola è autoctona di una specifica regione, di un'area circoscritta, di un piccolo paese, che ha fatto di un alimento un tratto distintivo della propria storia. Storia che andrebbe inevitabilmente persa e dimenticata se, davvero, alimenti come la carne sintetica prendessero piede nella società (<https://www.bioecogeo.com/cose-la-carne-sintetica/>).

Secondo alcune previsioni, la produzione commerciale di carne coltivata in futuro potrebbe sostituire la carne di bestiame convenzionale, così che la carne rossa tradizionale scomparirà dal mercato (Arshad et al., 2017). Tuttavia, non è realistico aspettarsi che la carne artificiale andrà a sostituire completamente la carne convenzionale a causa della complessità del mercato e alla vasta gamma di diversi gruppi di consumatori (Bonny et al., 2015).

Nell'ultimo periodo, il dibattito sulla carne in vitro è passato dal mondo accademico e scientifico a quello pubblico e politico e si iniziano a distinguere diverse linee di pensiero.

La prima e più diffusa opinione si lega al tema ambientale: i sostenitori di tale posizione sono concordi nell'affermare che la produzione della carne in vitro avrà l'indubbio vantaggio della sostenibilità, cioè consentirà la produzione di cibo in un modo pulito, riuscendo a garantire la stabilità dell'ecosistema senza sacrificare la biodiversità, come fanno invece gli allevamenti intensivi.

Immediatamente connessa a questa logica argomentativa si è diffusa la convinzione che facendo crescere la carne secondo la metodologia in vitro, di fatto, gli animali verranno sottratti dalle pesanti condizioni che oggi caratterizzano soprattutto i grandi allevamenti intensivi in cui, spesso, sono disattese le condizioni di benessere per gli animali allevati disciplinate dalla Comunità Europea.

Una terza argomentazione riguarda la conservazione e gestione delle risorse. Chi è a favore sottolinea come la carne coltivata sia un modo per garantire una maggiore sicurezza nella produzione, con conseguenze di sostenibilità per l'ambiente e di una più corretta gestione delle risorse ambientali.

Coloro che invece percepiscono la carne in vitro come un possibile problema, argomentano che la necessità di ricorrere a processi tecnologicamente avanzati e costosi porterà inevitabilmente ad ingiustizie e sperequazioni nella produzione del cibo perché concentrerà le attività produttive in mano a pochi soggetti.

Un'altra categoria di persone vede nella carne in vitro addirittura un miglioramento della produzione della carne rispetto a quella naturale e sostengono che la carne in vitro potrebbe permettere l'assunzione di proteine animali anche a tutti quei vegetariani che sostengono di non mangiare le carni per motivi etici e per contestare la cruenta macellazione a cui gli animali vengono sottoposti.

Fino ad ora, l'Unione Europea non ha autorizzato alcun prodotto a base di carne coltivata, ma la discussione sull'argomento è in corso e potrebbe avere implicazioni rilevanti per il futuro della produzione alimentare nell'UE (<https://www.marionegri.it/magazine/carne-coltivata>).

La controversia su come chiamare questa carne nasce dal metodo di produzione che consiste – spiega David Kaplan, direttore del Centro per l’agricoltura cellulare della Tuft University negli Usa – «nel prendere cellule da animali normalmente allevati per produrre carne e usare quelle cellule come “starter” per far crescere la carne al di fuori dell’animale». «È la stessa cosa della carne tradizionale, ma togliendo dal processo produttivo gli animali», è invece la definizione di Claire Bomkamp, scienziata del Good Food Institute. Comunque, l’Italia è il primo Paese europeo a vietarne l’uso. Un primato di cui essere orgogliosi, secondo il ministro Francesco Lollobrigida e la Coldiretti che per prima ha raccolto due milioni di firme. Una legge inutile, nel migliore dei casi, secondo gli avversari, perchè proibisce qualcosa che è già proibito: le autorità europee non hanno finora concesso alcuna autorizzazione alla commercializzazione e al consumo della carne di questo genere (non importa se chiamata, coltivata o sintetica) che stando a un regolamento del 1997 tuttora in vigore non può assolutamente essere messa in commercio, se non dopo un rigoroso iter che ancora non è iniziato. È vero, piuttosto, che sono in corso ricerche e sperimentazioni, che adesso potrebbero fermarsi in Italia lasciando il paese indietro rispetto agli altri. D’altro canto, laddove l’UE dovesse autorizzarne la commercializzazione, l’Italia non potrà opporre limitazioni in base alle norme comunitarie sulla circolazione delle merci (https://www.ilmessaggero.it/politica/carne_sintetica_come_si_produce_cellule_animali-7760475.html?refresh_ce).

Uno studio di McKinsey (McKinsey., 2020) effettuato nel 2020 colloca nel 2030 il raggiungimento della parità di prezzo tra bistecca “vera” e bistecca “in provetta”. Addirittura, l’azienda biotecnologica israeliana Future Meat Technologies, che ha appena raccolto 347 milioni di dollari di finanziamenti e annunciato l’apertura del primo impianto di produzione su larga scala negli Stati Uniti, riuscendo ad abbassare il costo di produzione a 1,70 dollari per 110 grammi di pollo “sintetico”, così da centrare l’obiettivo di parità dei prezzi prima di quanto il mercato preveda (Fernandes., 2020).

Proprio la riduzione dei costi, a detta degli esperti di Barclays research, crea una congiuntura favorevole per l’hamburger ingegnerizzato, spinto anche dalla crescita della popolazione mondiale, da motivazioni ecologiche legate al minore impatto ambientale delle emissioni (sempre che si ricorra a energia elettrica da fonti rinnovabili) e da questioni etiche connesse agli allevamenti di animali. Da qui la stima di Barclays che il giro d'affari della bistecca sintetica possa arrivare a valere sino a 450 miliardi di dollari nel 2040, ossia il 20% del mercato globale della carne.

4.4 Influenze sull'accettazione della carne coltivata

Il primo problema riguarda la percezione di “non naturalezza” associata alla carne coltivata. La percezione innaturale del processo di fabbricazione potrebbe portare a forti reticenze tra i consumatori, che considerano il processo una manipolazione della natura a vantaggio dell'uomo. In altre parole, nonostante la carne coltivata possa contribuire a risolvere importanti problemi etici rispetto al bestiame da allevamento e alla macellazione di animali destinati al consumo umano, e possa contribuire ad alleviare i problemi della fame nel mondo e alcune criticità ambientali, la tecnologia adottata per produrre carne in vitro potrebbe rappresentare un ostacolo alla sua diffusione (Verbeke et al., 2015).

Questo scetticismo verso la carne coltivata, rifiutando l'idea di un prodotto altamente tecnologico e sospettando che queste innovazioni siano pericolose o innaturali è un atteggiamento che rientra nel cosiddetto tecno-scetticismo.

D'altro canto, il carattere artificiale della carne coltivata potrebbe essere visto da altri come un vantaggio poiché la produzione in un ambiente completamente controllato impedirebbe eventuali rischi di contaminazione e diffusione di malattie (Hopkins & Dacey, 2008).

Per quanto riguarda la produzione e la sua scala operativa, Post (2014) sostiene che l'accettazione della carne coltivata potrebbe ulteriormente dipendere dalla futura implementazione della tecnologia e porta come esempio la carne di manzo “prodotta in casa”, in un mini-incubatore dall'aspetto simile a qualsiasi altro apparecchio usato in cucina. La carne coltivata prodotta nella propria cucina (“self-made”) potrebbe, secondo Post, essere percepita in modo molto diverso dal consumatore medio e, forse, anche come meno innaturale rispetto alla carne coltivata prodotta in scala industriale in una fabbrica da una multinazionale del settore alimentare (Verbeke et al., 2015).

Un altro problema importante riguarda la possibile repulsione, il cosiddetto “fattore yuck” inteso come la reazione iniziale dei consumatori all'idea di mangiare carne coltivata (Pluhar., 2010).

Come con molti altri nuovi alimenti o tecnologie applicate all'industria alimentare, l'idea di commercializzare un nuovo prodotto genera paura o diffidenza. I promotori della carne coltivata sostengono che quando il processo di produzione sarà perfezionato e spiegato al pubblico, la repulsione dei consumatori potrebbe diminuire. Ad esempio, anche il lancio di prodotti come il surimi o il tofu produsse all'epoca un notevole dibattito; la loro nuova natura suscitò molta preoccupazione nelle società occidentali prima che questi prodotti diventassero di uso comune, anche se consistevano in una materia prima che era familiare al pubblico (Verbeke et al., 2015).

Il terzo problema riguarda invece la salubrità percepita per un prodotto alimentare realizzato in laboratorio e le eventuali conseguenze per la salute umana, conseguenti al consumo di carne sintetica. I possibili rischi associati alla produzione e alla distribuzione di un nuovo prodotto “tecnologico” che non è stato ancora sufficientemente provato o valutato per i suoi effetti sulla salute dell’uomo, suscitano naturalmente preoccupazioni e dubbi nei consumatori (Verbeke et al., 2015).

Come si è già visto con l’introduzione di organismi geneticamente modificati (OGM) in alcuni prodotti alimentari, il lancio della carne coltivata sul mercato alimentare umano è destinato ad essere controverso e dibattuto e l’eventuale accettazione della carne in vitro potrà dipendere anche dalla presentazione ai consumatori dei vantaggi e/o degli svantaggi del prodotto da parte di competenti autorità pubbliche di garanzia (Fig. 8) (Verbeke et al., 2015).

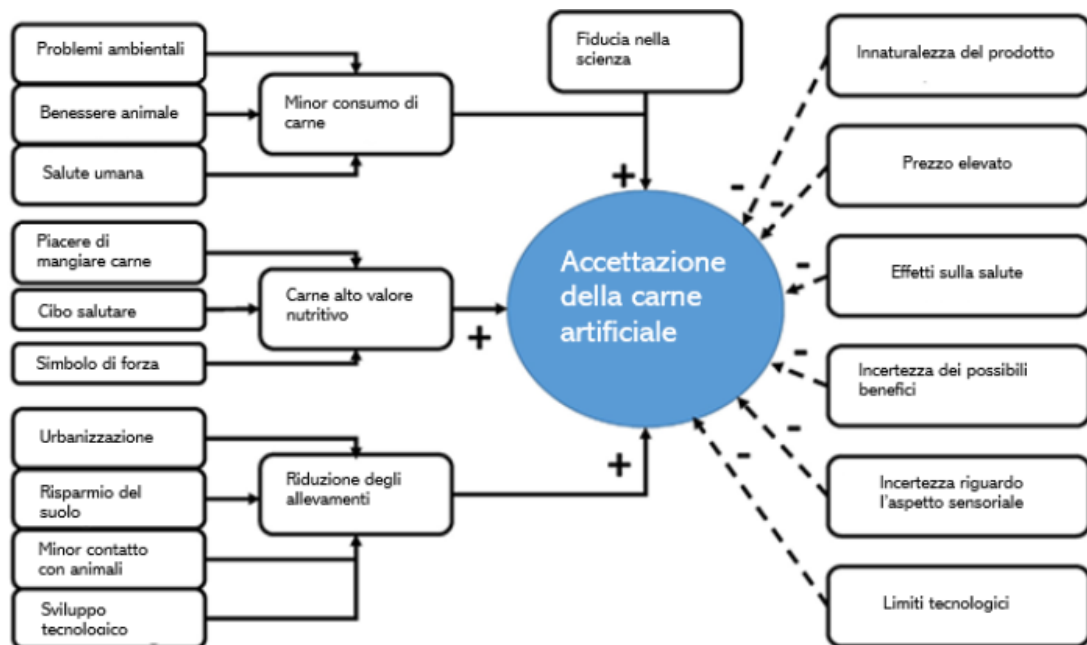


Figura 8: Fattori che contribuiscono all’accettazione della carne artificiale; forze favorevoli (+, linee piene) e sfavorevoli (-, linee tratteggiate) (fonte: Hocquette., 2016)

Capitolo 5

ASPETTI ECONOMICI

5.1 Il mercato della carne sintetica

Attualmente solo la carne convenzionale e alcuni tipi di prodotti sostitutivi della carne sono presenti sul mercato. In futuro l'agroecologia, la clonazione e le nuove tecniche applicate alle colture cellulari potrebbero fornire tecnologie e tecniche che consentiranno all'industria della carne in vitro di soddisfare le crescenti esigenze dei consumatori (Bonny et al., 2015).

La probabilità di una fornitura alimentare di carne coltivata non ha raggiunto l'attenzione del pubblico fino al 2013, quando è stato creato e presentato al pubblico il primo hamburger di carne coltivata. Questo approccio, che ha richiesto la coltura di 10.000 fibre muscolari individuali e la cui creazione è costata circa 330.000 dollari, ha stimolato l'innovazione nel campo, portando alle stime attuali per lo stesso hamburger da 85 grammi ora nell'ordine di soli 10 dollari (González & Koltrowitz., 2020).

Negli ultimi anni, diverse aziende hanno investito decine di milioni di dollari nello sviluppo della carne coltivata. Tuttavia, malgrado l'aumento di interesse, ci sono ancora vari ostacoli, dovuti in gran parte alla carenza di ricerche scientifiche non coperte dal segreto commerciale (Dolgin., 2019).

Gli investimenti privati nella realizzazione di carne prodotta in laboratorio sono in forte crescita, e le aziende inseguono la promessa di polpette, bistecche e hamburger coltivati in vitro invece che ottenuti da bestiame d'allevamento. Negli ultimi due anni, le start-up che hanno come obiettivo la produzione di "carne pulita" hanno raccolto decine di milioni di dollari da miliardari come Bill Gates e Richard Branson, e dai giganti dell'agricoltura Cargill e Tyson (Dolgin., 2019).

Alcune delle critiche mosse contro la carne in vitro rappresentano il timore che i costi elevati e la dipendenza da tecnologie avanzate possano creare disuguaglianze, concentrando la produzione di cibo nelle mani di poche grandi aziende. Infine, alcuni ritengono che l'accesso alla carne coltivata potrebbe essere limitato, accentuando le ingiustizie nel sistema alimentare globale. Alla domanda se reputano la carne in vitro come una cosa importante per l'umanità,

i cittadini intervistati rispondono in grande maggioranza sì. All'idea di trovare questa carne come un prodotto qualunque tra i diversi alimenti in vendita nei supermercati la risposta è di generale dissenso, mentre gli intervistati si dichiarano totalmente d'accordo con l'idea di sfamare le popolazioni povere del mondo con la carne coltivata in vitro. In altri termini si potrebbe sintetizzare l'opinione pubblica degli occidentali così: sì alla carne in vitro purché se le mangi qualcun altro!" (Benanti., 2016).

Sempre più organismi ed enti di regolamentazione, compresa l'Unione europea e la Food and Drug Administration negli USA, stanno agendo sul piano legislativo per permettere alle aziende agricole di produrre in modo più sostenibile per l'ambiente (Anonymous., 2003; Carlarne., 2007). L'aumentare della domanda di carne e la diminuzione delle risorse disponibili, renderà tutto il sistema normativo che disciplina la produzione di carne sicuramente più complesso e la produzione convenzionale di carne incorrerà in maggiori costi, rendendo la carne più costosa per il consumatore (NIAA., 2012). L'aumento di prezzo della carne tradizionale comporterà anche l'aumento della domanda di alternative economiche come la carne in vitro, prodotti derivati da proteine vegetali e micoproteine o proteine alternative di origine animale come quelle di insetti (Bonny et al., 2015).

I primi prodotti che potranno generare una forte concorrenza per le carni convenzionali sono i prodotti sostitutivi della carne derivati da piante o insetti. Questi prodotti sono i più attraenti per la produzione e hanno le barriere più basse alla commercializzazione in quanto vengono percepiti come "più naturali" dai consumatori. Premesso che tecnologia per la produzione di carne coltivata è ancora agli inizi, questa potrebbe arrivare a superare le sfide ed i limiti legati alla proliferazione di appropriate cellule staminali, alla disponibilità di mezzi di coltura puri e sani per la coltura cellulare, di adatti mezzi di differenziazione per la produzione di cellule muscolari, di tecniche specifiche di ingegneria tissutale per le fibre muscolari, allo sviluppo di bioreattori su scala industriale e all'accettabilità del consumatore (Haagsman et al., 2009).

Secondo alcune previsioni, la produzione commerciale di carne coltivata in futuro potrebbe sostituire la carne di bestiame convenzionale, così che la carne rossa tradizionale scomparirà dal mercato (Arshad et al., 2017). Tuttavia, non è realistico aspettarsi che la carne artificiale andrà a sostituire completamente la carne convenzionale (Hou et al., 2008) a causa della complessità del mercato e alla vasta gamma di diversi gruppi di consumatori (Bonny et al., 2015).

CONCLUSIONI

È chiaro che oggi la nostra società sta affrontando diverse sfide contemporaneamente, una delle più difficili delle quali è rappresentata dalla necessità di nutrire la popolazione mondiale in continua crescita e, allo stesso tempo, ridurre le emissioni ambientali dovute alla produzione di carne, senza tralasciare importanti aspetti come il benessere degli animali (Hocquette, 2016).

I sistemi convenzionali di produzione di carne sono oggi associati a diversi problemi come il benessere degli animali, le zoonosi, la limitata disponibilità di risorse naturali, la perdita di biodiversità legata alla distruzione di habitat naturali e al degrado ambientale dovuto all'inquinamento ed al riscaldamento globale (Arshad et al., 2017).

I sostenitori della carne artificiale stanno sviluppando una comunicazione strategica, che combina questi diversi aspetti e che sembra essere convincente per una parte significativa della popolazione, in particolare i giovani con un'istruzione elevata (Hocquette, 2016).

I media, dunque, hanno un'importante responsabilità nella diffusione di queste idee. Tuttavia, anche se una parte significativa della popolazione accetterebbe di assaggiare la carne artificiale almeno una volta, la sua accettazione sociale e globale è potenzialmente limitata a causa di un profondo desiderio di naturalezza di questo tipo di prodotto da parte dei consumatori.

La comunità scientifica globale riconosce che ci siano ancora vari ostacoli da superare prima che la carne artificiale possa raggiungere la fase di produzione industriale (nuova formulazione dei mezzi di coltura, sviluppo di bioreattori, valutazione della sicurezza per il consumo umano, riduzione del costo di produzione, ecc.). In aggiunta, un'ulteriore sfida riguarda l'arricchimento nutrizionale della carne sintetica. Rendere questo prodotto equivalente, se non superiore, alla carne convenzionale in termini di apporto di nutrienti essenziali come proteine di alta qualità, vitamine, minerali e composti bioattivi non è un compito semplice. Inoltre, garantire una biodisponibilità ottimale di tali nutrienti richiede un'attenta progettazione del mezzo di coltura e dei processi di produzione, il che aggiunge ulteriori livelli di complessità tecnica e costi. Questi aspetti rappresentano un punto cruciale per la futura accettazione e diffusione della carne sintetica. Di conseguenza, non è ancora prevedibile quando la carne

artificiale arriverà sul mercato e quando si concluderanno le varie ricerche scientifiche necessarie e/o obbligatorie prima della sua commercializzazione (Hocquette., 2016).

In futuro, diversi tipi di carne (da animali clonati, geneticamente modificati, ecc.), sostituti della carne -come prodotti derivati da proteine vegetali e micoproteine o proteine alternative di origine animale come gli insetti saranno disponibili sul mercato e saranno forti concorrenti anche della carne artificiale poiché si stanno già espandendo nel mercato internazionale (Hocquette, 2016).

Altre soluzioni possibili sono invece legate a variazioni delle abitudini alimentari dei consumatori, spostando le preferenze verso il consumo di proteine di origine vegetale a fronte di un minor consumo di quelle animali, o a sostanziali variazioni dei moderni metodi di allevamento degli animali di interesse zootecnico che forniscono carne edibile per migliorare la sostenibilità ed il loro impatto sull'ambiente.

In realtà tutte queste soluzioni non sono esclusive e si completano a vicenda e sono sicuramente più veloci da sviluppare a breve termine rispetto alla carne in vitro che ancora necessita di molte ricerche e prove di crescita in laboratorio.

In conclusione, la carne sintetica rappresenta una delle innovazioni più discusse nel panorama alimentare moderno. Tra vantaggi ecologici, implicazioni etiche e sfide tecnologiche, il dibattito su questo prodotto evidenzia le numerose sfaccettature che ne accompagneranno la diffusione. La possibilità di ridurre l'impatto ambientale e di limitare la sofferenza animale ha sicuramente il potenziale di attrarre una fascia di consumatori attenta a questi temi. Tuttavia, rimangono ancora importanti interrogativi riguardo alla sicurezza, ai costi, alla regolamentazione e alla percezione culturale della carne sintetica, soprattutto in paesi, come il nostro, dove le tradizioni legate alla carne sono ben radicate. Il futuro della carne sintetica dipenderà, quindi, non solo dai progressi scientifici e tecnologici, ma anche dalle scelte politiche, dall'accettazione sociale e dall'evoluzione dei valori culturali, segnando così un passaggio critico nel modo in cui affrontiamo la produzione e il consumo di carne.

BIBLIOGRAFIA

DOCUMENTI E SITI CONSULTATI

- 1) Antonuccio M.N., Chiesa I., Cignoni A., Dal Canto M., Fortunato G., Milieri C. (2017). <http://www.centropiaggio.unipi.it/sites/default/files/course/material/carne.pdf>.
- 2) Arshad, M. S., Javed, M., Sohaib, M., Saeed, F., Imran, A., Amjad, Z., & Yildiz, F. (2017). Tissue engineering approaches to develop cultured meat from cells: A mini review. *Cogent Food & Agriculture*, 3(1). <https://doi.org/10.1080/23311932.2017.1320814>
- 3) Benanti P. (2016). Frankenburger. La carne sintetica sfida la società globale. *ROCCA*, 1° dicembre, 2016, 23, 36-39, <http://www.rocca.cittadella.org/rocca/allegati/282/Rocca23benantiprimopiano.pdf>.
- 4) Bhat Z.F., Bhat H. (2011a). Animal-free meat biofabrication. *American Journal of Food Technology*, 6(6), 441–459.
- 5) Bhat Z.F., Bhat H. (2011b). Tissue engineered meat - Future meat. *Journal of Stored Products and Postharvest Research*, 2(1), 1–10.
- 6) Bhat Z.F., Bhat H. (2011c). Prospectus of cultured meat - advancing meat alternatives. *Journal of Food Science and Technology*, 48(2), 125–140, <https://doi.org/10.1007/s13197-010-0198-7>.
- 7) Bhat Z.F., Bhat H.F., Pathak V. (2013). Prospects for In vitro cultured meat-a future harvest. In: Lanza R., Langer R., Vacanti J.P., Eds., *Principles of Tissue Engineering*, Fourth Edition. Academic Press, Elsevier Publications, 1663–1678, DOI: 10.1016/B978-0-12-398358-9.00079-3.
- 8) Bhat Z.F., Kumar S., Fayaz H. (2015). In vitro meat production: challenges and benefits over conventional meat production. *Journal of Integrative Agriculture*, 14, 241–248.

- 9) Bonny S.P.F., Gardner G.E., Pethick D.W., Hocquette J. (2015). What is artificial meat and what does it mean for the future of the meat industry? *J Integr Agric*, 14, 255–263, [http://doi.org/10.1016/S2095-3119\(14\)60888-1](http://doi.org/10.1016/S2095-3119(14)60888-1).
- 10) Bomkamp C, Skaalure SC, Fernando GF, Ben-Arye T, Swartz EW, Specht EA. Scaffolding Biomaterials for 3D Cultivated Meat: Prospects and Challenges. *Adv Sci (Weinh)*. 2022 Jan;9(3). doi: 10.1002/advs.202102908. Epub 2021 Nov 16. PMID: 34786874; PMCID: PMC8787436.
- 11) Cerino G, Gaudiello E, Grussenmeyer T, Melly L, Massai D, Banfi A, Martin I, Eckstein F, Grapow M, Marsano A. Three dimensional multi-cellular muscle-like tissue engineering in perfusion-based bioreactors. *Biotechnol Bioeng*. 2016 Jan;113(1):226-36. doi: 10.1002/bit.25688. Epub 2015 Sep 4. PMID: 26126766.
- 12) Coldiretti (2013). <https://www.ilpuncocoldiretti.it/attualita/rapporto-fao-come-la-zootecnia-puo-contribuire-a-ridurre-le-emissioni/>.
- 13) Datar I., Betti M. Possibilities for an in vitro meat production system. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol*. 2010;11:13–22. doi: 10.1016/j.ifset.2009.10.007.
- 14) Ding S. Maintaining the Stemness of Satellite Cells during Long-Term Culture. Maastricht University, Proefschrift Maken; Maastricht, The Netherlands: 2019.
- 15) Duque P, Gómez E, Díaz E, Facal N, Hidalgo C, Díez C. Use of two replacements of serum during bovine embryo culture in vitro. *Theriogenology*. 2003 Feb;59(3-4):889-99. doi: 10.1016/s0093-691x(02)01134-2. PMID: 12517391.
- 16) Enrione J, Blaker JJ, Brown DI, Weinstein-Opppenheimer CR, Pepczynska M, Olguín Y, Sánchez E, Acevedo CA. Edible Scaffolds Based on Non-Mammalian Biopolymers for Myoblast Growth. *Materials (Basel)*. 2017 Dec 8;10(12):1404. doi: 10.3390/ma10121404. PMID: 29292759; PMCID: PMC5744339.
- 17) Fontana G, Gershlak J, Adamski M, Lee JS, Matsumoto S, Le HD, Binder B, Wirth J, Gaudette G, Murphy WL. Biofunctionalized Plants as Diverse Biomaterials for Human Cell Culture. *Adv Healthc Mater*. 2017 Apr;6(8):10.1002/adhm.201601225. doi: 10.1002/adhm.201601225. Epub 2017 Mar 20. PMID: 28319334; PMCID: PMC5490445.
- 18) Gandolfi F. (2007). http://www.agorascienza.it/application/files/2114/9908/3962/B_stam_pluripotenti_Gandolfi.pdf.
- 19) Gershlak JR, Hernandez S, Fontana G, Perreault LR, Hansen KJ, Larson SA, Binder BY, Dolivo DM, Yang T, Dominko T, Rolle MW, Weathers PJ, Medina-Bolivar F,

- Cramer CL, Murphy WL, Gaudette GR. Crossing kingdoms: Using decellularized plants as perfusable tissue engineering scaffolds. *Biomaterials*. 2017 May;125:13-22. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.02.011. Epub 2017 Feb 10. PMID: 28222326; PMCID: PMC5388455.
- 20) González A., Koltrowitz S. The \$280,000 Lab-Grown Burger Could Be a More Palatable \$10 in Two Years. [(accessed on 25 April 2020)]; Available online:<https://www.reuters.com/article/us-food-tech-labmeat/the-280000-lab-grown-burger-could-be-a-more-palatable-10-in-two-years-idUSKCN1U41W8>.
 - 21) Haagsman H.P., Hellingwerf K.J., Roelen B.A.J. (2009). Production of animal proteins by cell systems, Desk study on cultured meat myogenic satellite cell in a serum-free medium. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 99, 1–58.
 - 22) Handral H, Hua Tay S, Wan Chan W, Choudhury D. 3D Printing of cultured meat products. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2022;62(1):272-281. doi: 10.1080/10408398.2020.1815172. Epub 2020 Sep 21. PMID: 32951433.
 - 23) Hocquette JF. Is in vitro meat the solution for the future? *Meat Sci*. 2016 Oct;120:167-176. doi: 10.1016/j.meatsci.2016.04.036. Epub 2016 Apr 29. PMID: 27211873.
 - 24) https://static.wixstatic.com/media/f38f82_977b30875bfa4b6aab105e891a425d10~mv2.png/v1/fill/w_560,h_290,al_c,q_85,usm_0.66_1.00_0.01,enc_auto/Screenshot%202024-04-03%20alle%2022_40_03.png.
 - 25) <https://www.agrariansciences.it/2022/12/genome-editing-e-carne-coltivata-due.html>
 - 26) <https://www.centropiaggio.unipi.it/sites/default/files/course/material/carne.pdf>
 - 27) <https://www.flickr.com/photos/envisiontec/40447763650>
 - 28) https://www.ilmessaggero.it/politica/carne_sintetica_come_si_produce_cellule_animali-7760475.html?refresh_ce
 - 29) <https://www.marionegri.it/magazine/carne-coltivata>
 - 30) <https://www.sigmaaldrich.com/IT/it/products/cell-culture-and-analysis/cell-culture-supplements-and-reagents/fbs>.
 - 31) <https://techtransfer.universityofcalifornia.edu/NCD/29018.html>
 - 32) Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*. 2000 Dec;21(24):2529-43. doi: 10.1016/s0142-9612(00)00121-6. PMID: 11071603.
 - 33) Kirsch M, Morales-Dalmau J, Lavrentieva A. Cultivated meat manufacturing: Technology, trends, and challenges. *Eng Life Sci*. 2023 Nov 20;23(12). doi: 10.1002/elsc.202300227. PMID: 38089567; PMCID: PMC10711323.

- 34) Kolkman AM, Post MJ, Rutjens MAM, van Essen ALM, Moutsatsou P. Serum-free media for the growth of primary bovine myoblasts. *Cytotechnology*. 2020 Feb;72(1):111-120. doi: 10.1007/s10616-019-00361-y. Epub 2019 Dec 28. PMID: 31884572; PMCID: PMC7002633.
- 35) Langelaan, M. L. P., Boonen, K. J. M., Polak, R. B., Baaijens, F. P. T., Post, M. J., & van der Schaft, D. W. J. (2010). Meet the new meat: tissue engineered skeletal muscle. *Trends in Food Science and Technology*, 21(2), 59-66. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.11.001>.
- 36) Lanzoni, D., Bracco, F., Cheli, F., Colosimo, B.M., Moscatelli, D., Baldi, A., Rebucci, R., Giromini, C. Biotechnological and Technical Challenges Related to Cultured Meat Production. *Appl. Sci.* 2022, 12, 6771. <https://doi.org/10.3390/app12136771>.
- 37) Listrat A, Lebret B, Louveau I, Astruc T, Bonnet M, Lefaucheur L, Picard B, Bugeon J. How Muscle Structure and Composition Influence Meat and Flesh Quality. *ScientificWorldJournal*. 2016;2016:3182746. doi: 10.1155/2016/3182746. Epub 2016 Feb 28. PMID: 27022618; PMCID: PMC4789028.
- 38) Marotta F. (2013). Scaffold Decellularizzati per la Terapia Sostitutiva Renale. Tesi Laurea Triennale, Università degli Studi di Bologna, https://amslaurea.unibo.it/7011/1/Marotta_Francesco_Tesi.pdf.
- 39) McKinsey, Jordan Bar Am, Zafer Dallal Bashi, Angela Chen, Dimpy Jindal, Liane Ong, Derek Schlenker, Maria Schmidt, Warren Teichner. Cultivated meat: Out of the lab, into the frying pan 2020.
- 40) Miki H., Takagi M. Design of serum-free medium for suspension culture of CHO cells on the basis of general commercial media. *Cytotechnology*. 2014;67:689–697. doi: 10.1007/s10616-014-9778-0.
- 41) Mimura S., Kimura N., Hirata M., Tateyama D., Hayashida M., Umezawa A., Kohara A., Nikawa H., Okamoto T., Furue M. K. (2011). Growth factor-defined culture medium for human mesenchymal stem cells. *Int. J. Dev. Biol.* 55: 181-187. <https://doi.org/10.1387/ijdb.103232sm>.
- 42) Nam J., Brunelle A.R. (2019). Hydrogel Scaffold for Three-Dimensional Cell Culture. United States. The Regents of the University of California, Oakland, CA, USA, United States Patent Application 20190030211, <http://www.freepatentsonline.com/y2019/0030211.html>.

- 43) Ng S, Kurisawa M. Integrating biomaterials and food biopolymers for cultured meat production. *Acta Biomater.* 2021 Apr 1;124:108-129. doi: 10.1016/j.actbio.2021.01.017. Epub 2021 Jan 17. PMID: 33472103.
- 44) NIAA (Nevada Interscholastic Activities Association). (2012). In: Living in a world of decreasing resources and increasing regulation: how to advance animal agriculture. White paper. Information synthesized from the 2012 Annual Conference of the National Institute for Animal Agriculture. Denver, Colorado, USA. <https://www.animalagriculture.org/Resources/Documents/Conf%20-%20Symp/Conferences/2012%20Annual%20Conference/2012%20Annual%20Conference%20White%20Paper.pdf>.
- 45) Pluhar E.B. (2010). Meat and morality: Alternatives to factory farming. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, 23(5), 455-468.
- 46) Post MJ. Cultured meat from stem cells: challenges and prospects. *Meat Sci.* 2012 Nov;92(3):297-301. doi: 10.1016/j.meatsci.2012.04.008. Epub 2012 Apr 11. PMID: 22543115.
- 47) Redondo PA, Pavlou M, Loizidou M, Cheema U. Elements of the niche for adult stem cell expansion. *J Tissue Eng.* 2017 Aug 24;8:2041731417725464. doi: 10.1177/2041731417725464. PMID: 28890779; PMCID: PMC5574483.
- 48) Reiss J, Robertson S, Suzuki M. Cell Sources for Cultivated Meat: Applications and Considerations throughout the Production Workflow. *Int J Mol Sci.* 2021 Jul 13;22(14):7513. doi: 10.3390/ijms22147513. PMID: 34299132; PMCID: PMC8307620.
- 49) Richardson N.J., Macfie H.J., Shepherd R. (1994). Consumer attitudes to meat eating. *Meat Science*, 36, 57–65.
- 50) Scollan N.D., Greenwood P.L., Newbold C.J., Ruiz D.R.Y., Shingfield K.J., Wallace R.J., Hocquette J.-F. Future research priorities for animal production in a changing world. *Anim. Prod. Sci.* 2011;51:1–5. doi: 10.1071/AN10051.
- 51) Sharma S, Thind SS, Kaur A. In vitro meat production system: why and how? *J Food Sci Technol.* 2015 Dec;52(12):7599-607. doi: 10.1007/s13197-015-1972-3. Epub 2015 Jul 31. PMID: 26604337; PMCID: PMC4648904.
- 52) Tuomisto HL, de Mattos MJ. Environmental impacts of cultured meat production. *Environ Sci Technol.* 2011 Jul 15;45(14):6117-23. doi: 10.1021/es200130u. Epub 2011 Jun 17. PMID: 21682287.

- 53) Uezumi A, Ito T, Morikawa D, Shimizu N, Yoneda T, Segawa M, Yamaguchi M, Ogawa R, Matev MM, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Tsujikawa K, Tsuchida K, Yamamoto H, Fukada S. Fibrosis and adipogenesis originate from a common mesenchymal progenitor in skeletal muscle. *J Cell Sci.* 2011 Nov 1;124(Pt 21):3654-64. doi: 10.1242/jcs.086629. Epub 2011 Nov 1. PMID: 22045730.
- 54) Vagnozzi G. (2018). Produzione della carne coltivata in vitro: stato dell'arte, sfide, benefici e prospettive future. Tesi di Laurea Triennale, Università Politecnica delle Marche. <https://tesi.univpm.it/retrieve/6bfccd84-7cad-4559-b053-c2b28c65b912/Vagnozzi%20Giorgio%20TESI.pdf>.
- 55) Verbeke W., Sans P., Van Loo E.J. (2015). Challenges and prospects for consumer acceptance of cultured meat. *Journal of Integrative Agriculture*, 14, 285–294.
- 56) Verbruggen S, Luining D, van Essen A, Post MJ. Bovine myoblast cell production in a microcarriers-based system. *Cytotechnology*. 2018 Apr;70(2):503-512. doi: 10.1007/s10616-017-0101-8. Epub 2017 May 3. PMID: 28470539; PMCID: PMC5851947.
- 57) Yamanè T., Shimizu S. Proceedings of the Bioprocess Parameter Control. *Springer*; Berlin/Heidelberg, Germany: 2005. Fed-batch techniques in microbial processes; pp. 147–194.

REFERENZE CITATE DAI DOCUMENTI CONSULTATI

- Anonymous. (2003). Research priorities for a sustainable livestock sector in Europe. White paper. Animal Task Force, Horizon 2020. <http://www.animaltaskforce.eu/Portals/0/ATF/documents%20for%20scare/ATF%20white%20paper%20Research%20priorities%20for%20a%20sustainable%20livestock%20sector%20in%20Europe.pdf>.
- Ahfeldt T., Schinzel R.T., Lee Y.-K., Hendrickson D., Kaplan A., Lum D.H., Camahort R., Xia F., Shay J., Rhee E.P., et al. Programming human pluripotent stem cells into white and brown adipocytes. *Nat. Cell Biol.* 2012;14:209–219. doi: 10.1038/ncb2411.
- Aisen P., Enns C., Wessling-Resnick M. (2001). Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 33(10), 940–959.
- Al Tanoury Z., Rao J., Tassy O., Gobert B., Gapon S., Garnier J.-M., Wagner E., Hick A., Hall A., Gussoni E., et al. Differentiation of the human PAX7-positive myogenic precursors/satellite cell lineage in vitro. *Development*. 2020;147 doi: 10.1242/dev.187344.
- Allan S.J., De Bank P., Ellis M. Bioprocess Design Considerations for Cultured Meat Production with a Focus on the Expansion Bioreactor. *Front. Sustain. Food Syst.* 2019;3 doi: 10.3389/fsufs.2019.00044.
- Asnaghi M.A., Jungebluth P., Raimondi M.T., Dickinson S.C., Rees L.E., Go T., Cogan T.A., Dodson A., Parnigotto P.P., Hollander A.P., Birchall M.A., Conconi M.T., Macchiarini P., Mantero S. (2009). A double-chamber rotating bioreactor for the development of tissue-engineered hollow organs: From concept to clinical trial. *Biomaterials*, 30(29), 5260-5269, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.07.018>.
- Asner G.P., Elmore A.J., Olander L.P., Martin R.E., Harris A.T. (2004). Grazing systems, ecosystem responses and global change. *Annu Rev Environ Resour*, 29, 261–299.

- Baba K., Sankai Y. Development of biomimetic system for scale up of cell spheroids -building blocks for cell transplantation; Proceedings of the 2017 39th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC); Jeju Island, Korea. 11–15 July 2017; pp. 1611–1616.
- Badenes S., Fernandes T.G., Cordeiro C.S.M., Boucher S., Kuninger D., Vemuri M.C., Diogo M.M., Cabral J.M. Defined Essential 8™ Medium and Vitronectin Efficiently Support Scalable Xeno-Free Expansion of Human Induced Pluripotent Stem Cells in Stirred Microcarrier Culture Systems. PLoS ONE. 2016;11. doi: 10.1371/journal.pone.0151264.
- Bach A.D., Beier J.P., Stern-Staeter J., Horch R.E. (2004). Skeletal muscle tissue engineering. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 8(4), 413–422.
- Balbi C., Bolis S., Vassalli G., Barile L. Flow Cytometric Analysis of Extracellular Vesicles from Cell-conditioned Media. *J. Vis. Exp.* 2019. doi: 10.3791/59128.
- Ben-Arye T., Shandalov Y., Ben-Shaul S., Landau S., Zagury Y., Ianovici I., Lavon N., Levenberg S. Textured soy protein scaffolds enable the generation of three-dimensional bovine skeletal muscle tissue for cell-based meat. *Nat. Food*. 2020;1:210–220. doi: 10.1038/s43016-020-0046-5.
- Bentzinger C.F., Wang Y.X., Rudnicki M.A. Building Muscle: Molecular Regulation of Myogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2012;4. doi: 10.1101/cshperspect.a008342.
- Bettahalli N., Steg H., Wessling M., Stamatialis D. Development of poly(l-lactic acid) hollow fiber membranes for artificial vasculature in tissue engineering scaffolds. *J. Membr. Sci.* 2011;371:117–126. doi: 10.1016/j.memsci.2011.01.026.
- Bettahalli N.M.S., Vicente J., Moroni L., Higuera G.A., van Blitterswijk C., Wessling M., Stamatialis D.F. Integration of hollow fiber membranes improves nutrient supply in three-dimensional tissue constructs. *Acta Biomater.* 2011;7:3312–3324. doi: 10.1016/j.actbio.2011.06.012.
- Bodiou V., Moutsatsou P., Post M.J. Microcarriers for Upscaling Cultured Meat Production. *Front. Nutr.* 2020;7:10. doi: 10.3389/fnut.2020.00010.
- Bogliotti Y.S., Wu J., Vilarino M., Okamura D., Soto D.A., Zhong C., Sakurai M., Sampaio R., Suzuki K., Belmonte J.C.I., et al. Efficient derivation of stable primed pluripotent embryonic stem cells from bovine blastocysts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2018;115:2090–2095. doi: 10.1073/pnas.1716161115.

- Burdock G.A., Carabin G.I., Griffiths G.C. (2006). The importance of GRAS to the functional food and nutraceutical industries. *Toxicology*, 221(1), 17–27.
- Burton N.M., Vierck, J.L., Krabbenhoft L., Byrne K., Dodson M.V. (2000). Methods for animal satellite cell culture under a variety of conditions. *Methods in Cell Science*, 22(1), 51–61.
- Campbell B.M., Beare D.J., Bennett E.M., Hall-Spencer J.M., Ingram J.S.I., Jaramillo F., Ortiz R., Ramankutty N., Sayer J.A., Shindell D. Agriculture production as a major driver of the Earth system exceeding planetary boundaries. *Ecol. Soc.* 2017;22 doi: 10.5751/ES-09595-220408.
- Canavan H.E., Cheng X., Graham D.J., Ratner B.D., Castner D.G. (2005). Cell sheet detachment affects the extracellular matrix: A surface science study comparing thermal liftoff, enzymatic, and mechanical methods. *Journal of Biomedical Materials Research A*, 75(1), 1–13.
- Carlarne P.C. (2007). From the USA with love: sharing home-grown hormones, GMOs, and clones with a reluctant Europe. *Environmental Law*, 37, 301–338.
- Carrier R.L., Rupnick M., Langer R., Schoen F.J., Freed L.E., Vunjak-Novakovic G. (2002). Perfusion improves tissue architecture of engineered cardiac muscle. *Tissue Eng*, 8(2), 175–188.
- Caruso S.R., Orellana M.D., Mizukami A., Fernandes T.R., Fontes A.M., Suazo C.A.T., Oliveira V.D.C., Covas D., Swiech K. Growth and functional harvesting of human mesenchymal stromal cells cultured on a microcarrier-based system. *Biotechnol. Prog.* 2014;30:889–895. doi: 10.1002/btpr.1886.
- Chen G., Gulbranson D.R., Hou Z., Bolin J.M., Ruotti V., Probasco M.D., Smuga-Otto K., Howden S., Diol N.R., E Propson N., et al. Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nat. Methods*. 2011;8:424–429. doi: 10.1038/nmeth.1593.
- Croney C.C., Pley M., Capper J.L., Mench J.A., Priest S. (2012). Bioethics Symposium - The ethical food movement: What does it mean for the role of science and scientists in current debates about animal agriculture? *Journal of Animal Science*, 90(5), 1570–1582.
- Dababneh A.B., Ozbolat I.T. Bioprinting Technology: A Current State-of-the-Art Review. *J. Manuf. Sci. Eng.* 2014;136:061016. doi: 10.1115/1.4028512.
- Das M., Rumsey J.W., Bhargava N., Gregory C., Riedel L., Kang J.F., Hickman J.J. Developing a novel serum-free cell culture model of skeletal muscle differentiation

by systematically studying the role of different growth factors in myotube formation. *Vitr. Cell. Dev. Biol. Anim.* 2009;45:378–387. doi: 10.1007/s11626-009-9192-7.

- Dennis R.G., Smith B., Philp A., Donnelly K., Baar K. (2009). Bioreactors for guiding muscle tissue growth and development. *Advances in Biochemical Engineering/biotechnology*, 112, 39-79.
- D.Gholobova, L.Terrie, M.Gerard, H.Declercq, L.Thorrez, *Biomaterials* 2020, 235, 119708.
- Dias A.D., Elicson J.M., Murphy W.L. Microcarriers with Synthetic Hydrogel Surfaces for Stem Cell Expansion. *Adv. Health Mater.* 2017;16:1700072. doi: 10.1002/adhm.201700072.
- Dieryck W., Pagnier J., Poyart C., Marden M., Gruber V., Bournat P., Baudino S., Merot B. (1997). Human haemoglobin from transgenic tobacco. *Nature*, 386(6620), 29–30.
- Dolgin E. (2019). Sizzling interest in lab-grown meat belies lack of basic research. *Nature*, 566, 161-162, doi: 10.1038/d41586-019-00373-w, <https://www.nature.com/articles/d41586-019-00373-w>.
- FAO. (2006). In: *Livestock's long shadow—Environmental issues and options*. Ed. Publishing Management Service, Information Division, FAO, Rome, Italy, pp 390.
- Fedorovich N.E., Alblas J., Hennink W.E., Oner F., Dhert W. Organ printing: The future of bone regeneration? *Trends Biotechnol.* 2011;29:601–606. doi: 10.1016/j.tibtech.2011.07.001.
- Fernandes AM, de Souza Teixeira O, Palma Revillion JP, de Souza ÂRL. Conceptual evolution and scientific approaches about synthetic meat. *J Food Sci Technol.* 2020 Jun;57(6):1991-1999. doi: 10.1007/s13197-019-04155-0. Epub 2019 Nov 14. PMID: 32431325; PMCID: PMC7230089.
- Fujita H., Nedachi T., Kanzaki M. (2007). Accelerated de novo sarcomere assembly by electric pulse stimulation in C2C12 myotubes. *Experimental Cell Research*, 313(9), 1853–1865.
- Gao Y., Guo Y., Duan A., Cheng D., Zhang S., Wang H. Optimization of Culture Conditions for Maintaining Porcine Induced Pluripotent Stem Cells. *DNA Cell Biol.* 2014;33:1–11. doi: 10.1089/dna.2013.2095.
- Graber S.G., Woodworth R.C. (1986). Myoglobin expression in L6 muscle cells. *Journal of Biological Chemistry*, 261(20), 9150–9154.

- Greger M. (2007). The human/animal interface: Emergence and resurgence of zoonotic infectious diseases. *Critical Reviews in Microbiology*, 33(4), 243–299.
- Grounds M.D., White J.D., Rosenthal N, Bogoyevitch M.A. (2002). The Role of Stem Cells in Skeletal and Cardiac Muscle Repair. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 50, 589–610, <https://doi.org/10.1177/002215540205000501>.
- Guénant A.-C., Briand N., Capel E., Dumont F., Morichon R., Provost C., Stillitano F., Jeziorowska D., Siffroi J.-P., Hajjar R.J., et al. Functional Human Beige Adipocytes from Induced Pluripotent Stem Cells. *Diabetes*. 2017;66:1470–1478. doi: 10.2337/db16-1107.
- Hanga M.P., Ali J., Moutsatsou P., De La Raga F.A., Hewitt C., Nienow A., Wall I. Bioprocess development for scalable production of cultivated meat. *Biotechnol. Bioeng.* 2020;117:3029–3039. doi: 10.1002/bit.27469.
- Hammond T.G., Hammond J.M. Optimized suspension culture: The rotating-wall vessel. *Am. J. Physiol. Physiol.* 2001;281:F12–F25. doi: 10.1152/ajprenal.2001.281.1.F12.
- Henningsen J., Rigbolt K.T.G., Blagoev B., Pedersen B.K., Kratchmarova I. Dynamics of the Skeletal Muscle Secretome during Myoblast Differentiation. *Mol. Cell. Proteom.* 2010;9:2482–2496. doi: 10.1074/mcp.M110.002113.
- Hocquette J.F., Picard B., Bauchart D., Cassar-Malek I., Agabriel J. (2014). Autres voies pour obtenir des produits animaux. La viande de culture de cellules musculaires ou la viande sans animaux est-elle possible? In: Ellies M.P. Ed., *Les Filières Animales Françaises: Caractéristiques, Enjeux et Perspectives*. Lavoisier-Tec & Doc, Paris, France, pp. 501–504.
- Hopkins P.D., Dacey A. (2008). Vegetarian meat: Could technology save animals and satisfy meat eaters? *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, 21, 579–596.
- Hosoyama T., McGivern J.V., Van Dyke J.M., Ebert A.D., Suzuki M. Derivation of Myogenic Progenitors Directly from Human Pluripotent Stem Cells Using a Sphere-Based Culture. *Stem Cells Transl. Med.* 2014;3:564–574. doi: 10.5966/sctm.2013-0143.
- Hou F.J., Nan Z.B., Xie Y.Z., Li X.L., Lin H.L., Ren J.Z. (2008). Integrated crop-livestock production systems in China. *The Rangeland Journal*, 30, 221–231.
- Hu X., Li L., Yu X., Zhang R., Yan S., Zeng Z., Shu Y., Zhao C., Wu X., Lei J., et al. CRISPR/Cas9-mediated reversibly immortalized mouse bone marrow stromal stem

- cells (BMSCs) retain multipotent features of mesenchymal stem cells (MSCs). *Oncotarget*. 2017;8:111847–111865. doi: 10.18632/oncotarget.22915.
- Hynes K., Menicanin D., Gronthos S., Bartold M.P. *Methods in Molecular Biology*. Volume 1357. Humana Press; New York, NY, USA: 2014. Differentiation of iPSC to Mesenchymal Stem-Like Cells and Their Characterization; pp. 353–374.
 - *Int J Mol Sci*. 2021 Jul 13;22(14):7513. doi: 10.3390/ijms22147513.
 - *Int J Mol Sci*. 2022 May 27;23(11):6026.
 - Jain R.K., Au P., Tam J., Duda G., Fukumura D. (2005). Engineering vascularized tissue. *Nature Biotechnology*, 23(7), 821–823.
 - J. R. Gershlak, S. Hernandez, G. Fontana, L. R. Perreault, K. J. Hansen, S. A. Larson, B. Y. K. Binder, D. M. Dolivo, T. Yang, T. Dominko, M. W. Rolle, P. J. Weathers, F. Medina-Bolivar, C. L. Cramer, W. L. Murphy, G. R. Gaudette, *Biomaterials* 2017, 125, 13.
 - Jiwlawat N., Lynch E., Jeffrey J., Van Dyke J.M., Suzuki M. Current Progress and Challenges for Skeletal Muscle Differentiation from Human Pluripotent Stem Cells Using Transgene-Free Approaches. *Stem Cells Int*. 2018;2018:6241681. doi: 10.1155/2018/6241681.
 - Jiwlawat S., Lynch E., Glaser J., Smit-Oistad I., Jeffrey J., Van Dyke J.M., Suzuki M. Differentiation and sarcomere formation in skeletal myocytes directly prepared from human induced pluripotent stem cells using a sphere-based culture. *Differentiation*. 2017;96:70–81. doi: 10.1016/j.diff.2017.07.004.
 - Keriquel V., Oliveira H., Rémy M., Ziane S., Delmond S., Rousseau B., Rey S., Catros S., Amédée J., Guillemot F., et al. In situ printing of mesenchymal stromal cells, by laser-assisted bioprinting, for in vivo bone regeneration applications. *Sci. Rep*. 2017;7:1–10. doi: 10.1038/s41598-017-01914-x.
 - Korhonen H. (2002). Technology options for new nutritional concepts. *Int J Dairy Technol*, 55(2), 79–88.
 - LaBarge M.A., Blau H.M. Skeletal Muscle Stem Cells. In: Lanza R., Atala A., editors. *Handbook of Stem Cells*. 2nd ed. Academic Press; San Diego, CA, USA: 2013. pp. 631–640.
 - Latvala T., Niva M., Makela J., Pouta E., Heikkila J., Kotro J., Forsman-Hugg S. (2012). Diversifying meat consumption patterns: Consumers’ self-reported past behaviour and intentions for change. *Meat Science*, 92, 71–77.
 - Li B., Wang X., Wang Y., Gou W., Yuan X., Peng J., Guo Q., Lu S. Past, present, and future of microcarrier-based tissue engineering. *J. Orthop. Transl*. 2015;3:51–57. doi: 10.1016/j.jot.2015.02.003.
 - Lindskog E.K. The Upstream Process: Principal Modes of Operation. In: Jagschies G., Lindskog E., Łacki K., Galliher P., editors. *Biopharmaceutical Processing*. Elsevier; Amsterdam, The Netherlands: 2018. pp. 625–635.
 - Liu S. Batch Reactor. In: Liu S., editor. *Bioprocess Engineering*. 2nd ed. Elsevier; Amsterdam, The Netherlands: 2017. pp. 139–178.
 - Lowe K. (2006a). Blood substitutes: From chemistry to clinic. *Journal of Materials Chemistry*, 16(43), 4189–4196.
 - Lowe K. (2006b). Genomics and blood substitutes for 21st century Europe (“EuroBloodSubstitutes”). *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 34(6), 589–599, <https://doi.org/10.1080/10731190600974038>.

- Low M., Eisner C., Rossi F. Fibro/Adipogenic Progenitors (FAPs): Isolation by FACS and Culture. *Methods Mol. Biol.* 2017;1556:179–189. doi: 10.1007/978-1-4939-6771-1_9.
- Mantero S., Remuzzi A., Raimondi M.T., Ahluwalia A. (2009). Trasporto di massa nei sistemi biologici (prima parte). In: “Fondamenti di ingegneria dei tessuti per la medicina rigenerativa” PatronEditore, Granarolo Dell'Emilia, Bologna, Italia, <https://elearning.dei.unipd.it/.../Trasporto%20di%20massa%20nei%20sistemi%20biologi-01.pdf>.
- Martin I., Wendt D., Heberer M. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends Biotechnol.* 2004;22:80–86. doi: 10.1016/j.tibtech.2003.12.001.
- Martin Y., Vermette P. (2005). Bioreactors for tissue mass culture: Design, characterization, and recent advances. *Biomaterials*, 26(35), 7481-7503, DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.05.057.
- Marques A., Lourenco H.M., Nunes M.L., Roseiro C., Santos C., Barrabco A., Rainieri S., Langerholc T., Cencic A. (2011). New tools to assess toxicity, bioaccessibility and uptake of chemical contaminants in meat and seafood. *Food Research International*, 44, 510–522.
- Mattick C.S., Landis A.E., Allenby B.R., Genovese N. J. (2015). Anticipatory life cycle analysis of in vitro biomass cultivation for cultured meat production in the United States. *Environmental Science and Technology*, 49, 11941–11949.
- Meinert C., Schrobback K., Huttmacher D.W., Klein T.J. A novel bioreactor system for biaxial mechanical loading enhances the properties of tissue-engineered human cartilage. *Sci. Rep.* 2017;7:1–14. doi: 10.1038/s41598-017-16523-x.
- Miura T., Yuasa N., Ota H., Habu M., Kawano M., Nakayama F., Nishihara S. Highly sulfated hyaluronic acid maintains human induced pluripotent stem cells under feeder-free and bFGF-free conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2019;518:506–512. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.08.082.
- Moroni, L.; Burdick, J.; Highley, C.; Lee, S.J.; Morimoto, Y.; Takeuchi, S.; Yoo, J. Biofabrication strategies for 3D in vitro models and regenerative medicine. *Nat. Rev. Mater.* 2018, 3, 21-37.
- Naumann K., Pette D. (1994). Effects of chronic stimulation with different impulse patterns on the expression of myosin isoforms in rat myotube cultures. *Differentiation: Research in Biological Diversity*, 55(3), 203–211.

- Pandurangan M., Kim D.Y. (2015). A novel approach for in vitro meat production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 13, 5391-5395, DOI: 10.1007/s00253-015-6671-5.
- Papanikolaou G., Pantopoulos K. (2005). Iron metabolism and toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 202(2), 199–211.
- Park Y.H., Gong S.P., Kim H.Y., Kim G.A., Choi J.H., Ahn J.Y., Lim J.M. Development of a serum-free defined system employing growth factors for preantral follicle culture. *Mol. Reprod. Dev.* 2013;80:725–733. doi: 10.1002/mrd.22204.
- Pérez C.M.R., Alvarez Z., Chen F., Aytun T., Stupp S.I. Mimicking the Bioactivity of Fibroblast Growth Factor-2 Using Supramolecular Nanoribbons. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2017;3:2166–2175. doi: 10.1021/acsbiomaterials.7b00347.
- Radtke A.L., Herbst-Kralovetz M.M. Culturing and Applications of Rotating Wall Vessel Bioreactor Derived 3D Epithelial Cell Models. *J. Vis. Exp.* 2012;3868. doi: 10.3791/3868.
- Rebelo S.P., Costa R., Silva M.M., Marcelino P., Brito C., Alves P.M., Montes A.C.M.B.A. Three-dimensional co-culture of human hepatocytes and mesenchymal stem cells: Improved functionality in long-term bioreactor cultures. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2015;11:2034–2045. doi: 10.1002/term.2099.
- Robin J., Wright W.E., Zou Y., Cossette S.C., Lawlor M.W., Gussoni E. Isolation and immortalization of Patient-derived Cell Lines from Muscle Biopsy for Disease Modeling. *J. Vis. Exp.* 2015;52307 doi: 10.3791/52307.
- Saunders R., Derby B. Inkjet printing biomaterials for tissue engineering: Bioprinting. *Int. Mater. Rev.* 2014;59:430–448. doi: 10.1179/1743280414Y.0000000040.
- Specht E.A., Welch D.R., Clayton E.M.R., Lagally C.D. Opportunities for applying biomedical production and manufacturing methods to the development of the clean meat industry. *Biochem. Eng. J.* 2018;132:161–168. doi: 10.1016/j.bej.2018.01.015.
- Specht L. An Analysis of Culture Medium Costs and Production Volumes for Cultivated Meat. GFI; Washington, DC, USA: 2020. p. 14.
- Spier M., Vandenberghe L., Medeiros A., Soccol C. Bioreactors: Design, Properties, and Applications. Volume 1. Nova Science Publishers, Inc.; Hauppauge, NY, USA: 2011. Application of different types of bioreactors in bioprocesses; pp. 53–87.
- Stout A.J., Mirliani A.B., White E.C., Yuen J.S.K., Kaplan D.L. Simple and effective serum-free medium for sustained expansion of bovine satellite cells for cell cultured meat. *bioRxiv.* 2021 doi: 10.1101/2021.05.28.446057.
- S.Das, K.D.Browne, F.A.Laimo, J.C.Maggiore, M.C.Hilman, H. Kaisaier, C. A. Aguilar, Z. S. Ali, F. Mourkioti, D. K. Cullen, *Commun. Biol.* 2020, 3, 330.
- S.Levenberg, J.Rouwkema, M.Macdonald, E.S.Garfein, D.S.Kohane, D. C. Darland, R. Marini, C. A. van Blitterswijk, R. C. Mulligan, P. A. D'Amore, R. Langer, *Nat. Biotechnol.* 2005, 23, 879.
- Takahashi K., Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell.* 2006;126:663–676. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.

- Tripathi G, Basu B. (2012). A porous hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering: Physico-mechanical and biological evaluations. *Ceramics International*, 38 (1) 341-349, <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2011.07.012>.
- Uezumi A., Fukada S.-I., Yamamoto N., Takeda S., Tsuchida K. Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat. Cell Biol.* 2010;12:143–152. doi: 10.1038/ncb2014.
- Vilarino M., Soto D.A., Bogliotti Y.S., Yu L., Zhang Y., Wang C., Paulson E., Zhong C., Jin M., Belmonte J.C.I., et al. Derivation of sheep embryonic stem cells under optimized conditions. *Reproduction*. 2020;160:761–772. doi: 10.1530/REP-19-0606.
- Warriss P.D., Rhodes D.N. Haemoglobin concentrations in beef. *J. Sci. Food Agric.* 1977;28:931–934. doi: 10.1002/jsfa.2740281012.
- Williams C., Wick T.M. Endothelial Cell–Smooth Muscle Cell Co-Culture in a Perfusion Bioreactor System. *Ann. Biomed. Eng.* 2005;33:920–928. doi: 10.1007/s10439-005-3238-0.
- Wilson S.J., Harris A.J. (1993). Formation of myotubes in aneural rat muscles. *Developmental Biology*, 156(2), 509–518.
- Yamamoto Y., Ito A., Jitsunobu H., Yamaguchi K., Kawabe Y., Mizumoto H., Kamihira M. Hollow Fiber Bioreactor Perfusion Culture System for Magnetic Force-Based Skeletal Muscle Tissue Engineering. *J. Chem. Eng. Jpn.* 2012;45:348–354. doi: 10.1252/jcej.11we237.
- Yu J., Vodyanik M.A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J.L., Tian S., Nie J., Jonsdottir G.A., Ruotti V., Stewart R., et al. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science*. 2007;318:1917–1920. doi: 10.1126/science.1151526.
- Zhang D., Mai Q., Li T., Huang J., Ding C., Jia M., Zhou C., Xu Y. Comparison of a xeno-free and serum-free culture system for human embryonic stem cells with conventional culture systems. *Stem Cell Res. Ther.* 2016;7:101. doi: 10.1186/s13287-016-0347-7.
- Zhang H., Zou K., Tesseur I., Wyss-Coray T. Small Molecule TGF-beta Mimetics as Potential Neuroprotective Factors. *Curr. Alzheimer Res.* 2005;2:183–186. doi: 10.2174/1567205053585756.
- Zuckerman S.H., Doyle M.P., Gorczynski R., Rosenthal G.J. (1998). Preclinical biology of recombinant human hemoglobin, rHb1.1. *Artificial Cells, Blood Substitutes, Immobilization, Biotechnology*, 26(3), 231–257.

RINGRAZIAMENTI

Desidero esprimere la mia più profonda gratitudine alla professoressa Raffaelli, relatrice di questa tesi di laurea, per la costante disponibilità, l'aiuto e la pazienza dimostrata nel corso della stesura della tesi.

Un sentito ringraziamento va ai miei genitori, che mi hanno accompagnato in questo cammino con un supporto incondizionato, rispettando i miei tempi e senza mai mettermi sotto pressione. La loro presenza e comprensione sono stati per me fondamentali.

Infine, ringrazio i miei compagni di università, con cui ho condiviso momenti di studio, incoraggiamento e amicizia. La loro compagnia ha reso questi anni universitari un'esperienza indimenticabile.