

La carne coltivata: stato dell'arte e criticità



Maurizio Ferri - Coordinatore scientifico SIMeVeP
Nike Schiavo - Agricoltura Cellulare Italia APS
Maria Grazia Cofelice - Servizio Veterinario, ASL Pescara
Francesca Lombardo - Servizio Veterinario, ASL Pescara

Società Italiana di Medicina Veterinaria Preventiva

- Marzo 2024 -

Disclaimer: è consentita la copia, riproduzione e distribuzione a scopi non commerciali del presente materiale previa citazione degli autori.

Sommario

1.	Il contesto	2
1.	Un po' di storia	3
2.	Carne coltivata e religione.....	6
3.	Il processo di produzione di carne coltivata	7
4.	Le fonti cellulari ideali per produrre carne coltivata	9
5.	Pericoli potenziali associati alla carne coltivata	11
6.1	Pericoli microbiologici	12
6.2	Pericoli chimici (antibiotici, tossine, allergeni).....	13
6.3	Pericoli mutageni	15
6.	Il profilo nutrizionale	17
7.	Efficienza energetica ed impatto ambientale.....	18
8.1	Strategie alternative di efficienza energetica.....	20
8.	Conclusioni.....	22
10.	Riferimenti.....	24

1. Il contesto

La carne coltivata, nota anche come carne a base cellulare, fa parte del campo emergente dell'agricoltura cellulare che mira a realizzare prodotti agricoli utilizzando cellule staminali provenienti da animali in vita o da carcasse al macello e coltivate in bioreattori, senza sacrificare animali o coltivazioni. E' una tecnologia emergente e in costante sviluppo, che si propone come alternativa alla carne convenzionale per via di numerosi vantaggi consistenti in: riduzione dell'allevamento e macellazione, minor impatto ambientale legato all'utilizzo di suolo e acqua, riduzione delle emissioni di gas serra e deforestazione, minor rischio di trasmissione di malattie zoonotiche (es. influenza aviaria, salmonella) [1], minor uso di antibiotici [2]. Inoltre poiché la popolazione globale continua a crescere e vi sono preoccupazioni su come soddisfare la domanda di prodotti di origine animale entro il 2050 [3][4], la carne coltivata costituisce un fonte proteica alternativa, efficiente e sostenibile per le generazioni future. In analogia alle nuove tecnologie, il tema carne coltivata si impone nella narrativa attuale con posizioni estreme che vanno dal rifiuto ideologico di tutto ciò che è alimentazione artificiale (es. neofobia) all'apertura verso l'innovazione tecnologica e diversificazione dell'industria alimentare. Il vantaggio è creare prodotti etici, sostenibili e meno impattanti sull'ambiente. La società di consulenza globale AT Kearney ha previsto che, a causa dell'elevato impatto ambientale e dei problemi di benessere degli animali associati alla produzione di carne convenzionale, entro il 2040 il 60% del fabbisogno globale di carne sarà soddisfatto da metodi di produzione non convenzionali come la carne in vitro (35%) o analoghi di origine vegetale per un valore di circa 630 miliardi di dollari [5]. (Figura 1)

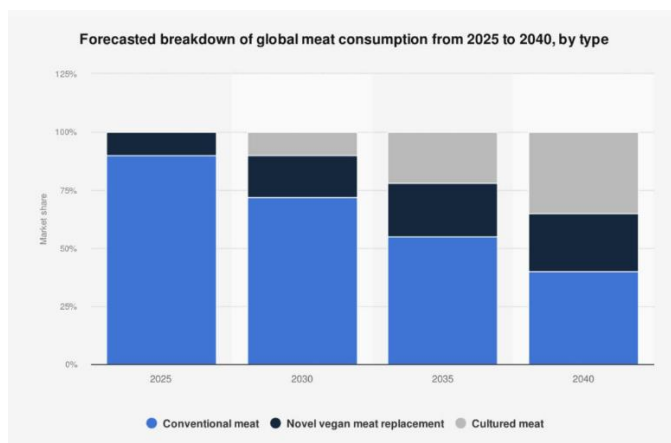


Fig. 1 Ripartizione prevista del consumo globale di carne dal 2025 al 2040, per tipologia (UN, Kearney, 2021)

Il settore è attualmente orientato anche verso prodotti coltivati a partire dal pesce, latte, uova ed altri alimenti di origine animale. I recenti sviluppi biotecnologici hanno aperto la strada anche alle applicazioni della fermentazione di precisione che a differenza della fermentazione tradizionale per la trasformazione degli alimenti, basata sulla crescita microbica e sul metabolismo, sfrutta microrganismi ingegnerizzati e li trasforma in fabbriche di cellule per la produzione mirata di ingredienti alimentari come la vanillina, L-arabinosio e resveratrolo da *Saccharomyces cerevisiae* ingegnerizzato, acidi grassi omega-3 da *Yarrowia lipolitica* ingegnerizzata o leghemoglobina di soia e ovoalbumina da *Komagataella phaffii* e *Trichoderma reesei* ingegnerizzati. Il cammino della carne coltivata comunque non è facile, ci sono molte sfide da superare, inclusi gli elevati costi di produzione, la scalabilità e l'accettazione da parte dei consumatori. Riguardo alla corretta terminologia, la carne coltivata viene chiamata con diversi nomi: cell-based meat, cultivated meat, lab-grown meat, clean meat, cultured meat o in vitro meat. Sul fronte della comunicazione della carne

coltivata, se gli alimenti o le tecnologie alimentari vengono percepiti come innaturali, di norma è difficile venga accettata da i consumatori se vengono utilizzati termini come carne sintetica o artificiale che contribuiscono a suscitare un atteggiamento di timore e diffidenza. Per non generare confusione, 'cellulare' e 'coltivato' sono i termini più usati dall'industria e dalle autorità regolatorie, evitando termini, come carne sintetica o artificiale, che contribuiscono a suscitare un atteggiamento di timore e diffidenza nei consumatori. In assenza di una definizione legale, l'EFSA intende per alimenti derivati da colture cellulari di origine animale o vegetale 'alimenti prodotti dalla propagazione di cellule animali/vegetali assistita da tecniche di ingegneria tissutale'. Nel rapporto FAO-WHO (2023) [6] sono elencati 23 diverse denominazioni (vedi figura 1).

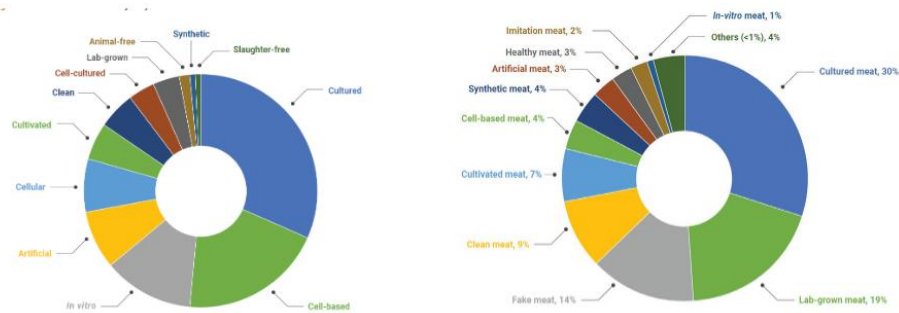


Figura 1. Denominazioni di carne coltivata (WHO-FAO 2023)

1. Un po' di storia

L'idea del cibo sintetico o coltivato in laboratorio nasce nel 1923 con JBS Haldane nel suo lavoro 'Dedalo della scienza e del futuro' [7]. Nel 1930, Frederick Smith, come previsione del futuro del mondo nel 2030 menzionò bistecche e petti di pollo prodotti in laboratorio [8]. Nel 1997 viene realizzato il primo brevetto di carne coltivata da Willen Van Elen [9]. Nel 2001 la NASA conduce la prima ricerca su coltura di cellule muscolari di tacchino, segue il primo filetto di pesce commestibile coltivato dalle cellule di pesci rossi, prodotto da NSR/Tuoro Applied BioScience Research Consortium, e nel 2002 pubblica la prima ricerca di carne coltivata [10]. Nel periodo 2000-2010 iniziano ad arrivare i primi finanziamenti per start-up e non profit (New Harvest). Nel 2013 Mark Post, farmacologo dell'Università di Maastricht, presenta al pubblico il primo prototipo di carne a base di cellule di muscolo scheletrico bovino sotto forma di hamburger, con un prezzo di circa 290 mila euro per 142 grammi [11]. Ma in dieci anni i costi crollano per il miglioramento dei fattori produttivi. A partire dal 2020 la metodologia di produzione alimentare basata sulla coltivazione delle cellule si sposta dai laboratori agli impianti di produzione e a marzo 2022 l'hamburger artificiale raggiunge un prezzo tra i 9 e i 10 dollari. Con il livello tecnologico attuale, il costo stimato di produzione della carne coltivata è di circa 63 dollari al kg [12]. Ma per essere direttamente competitiva ad esempio con la carne bovina, il costo di produzione, devono scendere a un livello inferiore a 9 dollari/kg di carne. Attualmente nel mondo si contano 159 startup impegnate nella ricerca sui cibi coltivati di cui 48 negli Stati Uniti e 47 nell'Unione Europea (UE) [13]. (Figura 2)



Fig. 3. Distribuzione geografica delle aziende produttrici di carne coltivata

Sul fronte della commercializzazione, è la Singapore Food Agency a sdoganare questo tipo di prodotto nel 2020, autorizzando la vendita di crocchette di pollo a base di cellule coltivate da parte di Good Meat, sussidiaria della startup americana Eat Just. Negli Stati Uniti, dopo una prima consultazione pre-commercializzazione della Food and Drug Administration (FDA) nel 2022, a Giugno 2023 il Dipartimento dell'Agricoltura degli Stati Uniti (USDA) autorizza due ditte Good Meat e Upside Foods per la distribuzione commerciale di prodotti a base di pollo coltivato [14]. Eat Just ha annunciato l'intenzione di costruire un impianto statunitense con 10 bioreattori da 250.000 litri sufficienti a produrre 14 milioni di kg di prodotto all'anno. Nel 2024 è arrivata la via libera alla vendita di carne coltivata da cellule bovine in Israele dove fino a ieri era possibile servirla nel ristorante 'The Chicken' di Tel Aviv previa liberatoria firmata dai clienti. Il ministero della Sanità israeliano ha infatti deciso di approvare il commercio del prodotto messo a punto dalla startup Aleph Farms. Israele finanzia attualmente numerosi progetti di ricerca sulla carne coltivata e accoglie tre delle prime otto aziende al mondo (Aleph Farms, Super Meat e Believer Meats). Per gli aspetti regolatori affinché la carne coltivata possa essere commercializzata nell'UE, deve essere valutata dall'EFSA come novel food o nuovo alimento ai sensi del regolamento (UE) 2015/2283 [15]. Se realizzata con cellule ingegnerizzate o immortalizzate è prevista una valutazione di sicurezza ai sensi del regolamento (CE) n. 1829/2003 sugli alimenti e mangimi OGM. Le decisioni sull'autorizzazione all'immissione in commercio e sui requisiti di etichettatura verranno prese dalla Commissione Europea insieme agli Stati membri dell'UE, che valuteranno anche gli aspetti economici, di benessere degli animali, sociali e/o di altro tipo. L'EFSA, al passo con gli sviluppi tecnologici del settore, è attualmente impegnata a sviluppare le competenze per la valutazione del rischio e per la definizione delle relative metodologie. Ad oggi, l'Authority ha ricevuto la prima richiesta di pre-autorizzazione per la salsiccia coltivata dalla azienda biotecnologica tedesca, The Cultivated B che, in stretta collaborazione con la consociata The Family Butchers, intende produrre salsicce ibride composte da ingredienti vegani e quantità significative di carne coltivata [16]. In Europa, il Regno Unito, uno dei principali attori chiave a livello globale per lo sviluppo di sistemi di colture cellulari su larga scala e che si avvale del lavoro dei bioingegneri dell'Università di Bath, è pronto a firmare un accordo di collaborazione con Israele [17]. Il Governo tedesco nel suo budget 2024 finanzia e promuove alternative alla carne, come i latticini fermentati con tecnologie di

precisione, prodotti a base vegetale e carne coltivata e destina quote rilevanti di investimento per la creazione di un centro di competenza sulle proteine future e di un forum di stakeholders sul tema [18]. I Paesi Bassi hanno varato una legge che istituisce un comitato di esperti incaricato di analizzare la sicurezza dei prodotti candidati da due aziende olandesi pionieri nella produzione di alimenti a base cellulare, Mosa Meat e Meatable che intendono organizzare assaggi riservati solo agli addetti ai lavori. Le tre grandi startup del settore – Believer Meats, Eat Just e Upside Foods hanno raccolto più di 1,2 miliardi di dollari in finanziamenti combinati per portare i prodotti sugli scaffali dei supermercati [19]. Anche la Svizzera ha avviato il processo di autorizzazione e vendita al pubblico della carne coltivata: l'Ufficio federale per la sicurezza alimentare e veterinaria ha ricevuto la richiesta inoltrata dalla start-up israeliana Aleph Farms per la commercializzazione della bistecca di manzo prodotta in laboratorio [20]. L'UE finanzia diversi progetti di carne coltivata con Horizon Europe, il principale programma di ricerca e innovazione, in linea con la strategia Farm-to-Fork e Green Deal. Nell'ottobre 2021, con il programma REACT-EU lanciato in risposta alla pandemia Covid-19, viene assegnato alle aziende olandesi Mosa Meat e Nutreco un finanziamento di 2 milioni di euro per studiare soluzioni finalizzate a ridurre il costo dei terreni di coltura e migliorare ulteriormente la sostenibilità [21]. A giugno 2021, Horizon Europe pubblica tre bandi per un totale di 32 milioni di euro per la ricerca di proteine alternative (Cultured meat and cultured seafood- state of play and future prospects) e lo studio degli aspetti della sostenibilità in rapporto all'impatto ambientale, economico e sociale [22]. Gli investimenti pubblici nell'UE sono in aumento: a gennaio 2021, il governo spagnolo assegna 5,2 milioni di euro a BioTech Foods per studiare i benefici sanitari legati alla carne coltivata. La brasiliana JBS, la seconda più grande azienda alimentare nel mondo, nel 2023 ha annunciato 100 milioni di dollari di investimenti nella start-up spagnola Bio Tech Foods per la costruzione in Spagna di uno stabilimento per la ricerca e produzione di carne coltivata da completare nel 2024 [23]. Anche la BRF SA, una azienda brasiliana di trasformazione delle carni avicole e suine, si era avventurata nel 2021 nel settore della carne coltivata con un investimento di 2,5 milioni di dollari nella start-up israeliana Aleph Farms [24]. In Italia l'unica start-up trentina, Bruno Cell, finanzia e gestisce progetti di ricerca volti ad acquisire il know-how e a brevettare processi di proliferazione cellulare ottimizzati. A Gennaio 2024 viene lanciato il programma FEASTS (Fostering European Cellular Agriculture for Sustainable Transition Solutions) finanziato dal programma Horizon From-farm-to-fork a cui partecipa un consorzio di 36 istituzioni indipendenti provenienti da 17 paesi [25]. Il progetto di ricerca interdisciplinare, finanziato con 7 milioni di euro in tre anni, intende approfondire le tecnologie coinvolte nella produzione sostenibile di carne e frutti di mare anche in rapporto agli aspetti nutrizionali, sanitari, normativi, di sicurezza alimentare, nonché etici. I prezzi proibitivi della carne coltivata hanno spinto alcuni giganti dell'industria della carne come JBS, Tyson Food, Kellogg's e Cargill ad investire in ricerca e sviluppo per ridurre i costi di produzione e rivolgersi a startup emergenti e aziende di biotech. Gli investimenti pubblici e privati nel settore della carne coltivata hanno registrato una crescita esponenziale da sei miliardi di dollari nel 2016 a 1.380 nel 2021 [26]. La start-up americana Wildtype ha ottenuto finanziamenti per oltre 140 milioni di dollari da investitori tra cui L Catterton, Leonardo Di Caprio, Cargill e Bezos Expeditions. La loro struttura potrebbe in teoria produrre 200.000 kg all'anno di salmone a base cellulare [27]. Negli Stati Uniti è stato istituito un centro di eccellenza nell'agricoltura cellulare presso la Tufts University, finanziata con 10 milioni di dollari dalla USDA e con la finalità di lanciare un'alleanza tecnologica per la carne coltivata attraverso un consorzio di aziende, tra cui la start-up cinese CellX: l'università istituisce una task force specializzata per risolvere i problemi di ricerca proposti dalle aziende, mentre le aziende forniscono suggerimenti dal punto di vista industriale [28]. Una iniziativa simile viene seguita nel Regno Unito con il finanziamento di un polo di produzione di agricoltura cellulare guidato dall'Università di Bath. L'azienda americana Defined Bioscience che lavora sulle cellule staminali nei settori delle scienze della vita e della carne

coltivata, ha ricevuto dal National Institutes of Health 1,5 milioni di dollari per sviluppare un supplemento per i terreni delle colture cellulari [29]. Le opportunità di mercato sono notevoli: da una stima di Good Food Institute (GFI) ad oggi si contano investimenti per un totale di 3 miliardi di dollari, che potrebbero oscillare tra 5 e 25 miliardi di dollari entro il 2030, a seconda del livello di accettazione da parte dei cittadini e degli sviluppi tecnologici [30]. Riguardo alle proiezioni di crescita della carne coltivata si stima che nel 2040 occuperà il 35% della quota di mercato, rispetto ad una diminuzione del 40% della carne convenzionale [3]. Mentre in quasi tutti i Paesi europei si segnalano progetti di ricerca, sostegno alle start-up e collaborazioni internazionali, in Italia, in controtendenza con quanto accade nel mondo, ad ottobre 2023 viene promulgata una legge che vieta la produzione, commercializzazione e importazione della carne coltivata, ma anche l'uso di termini come burger o bistecca per prodotti a base vegetale. Con una logica distorta che non ha precedenti nel diritto, questa legge dice agli italiani cosa devono o non devono mangiare, soffoca l'innovazione e viola la normativa comunitaria. Per effetti di questa legge l'Italia rischia di essere tagliata fuori da un'opportunità di ricerca e di business e da progetti industriali per la vendita di prodotti più eco-climate friendly. A pagare le spese saranno i centri di ricerca universitari e start-up come la Bruno Cell di Trento. Il provvedimento del Governo Italiano si rivela, oltre che oscurantista ed antiscientifico, anacronistico, paradossale (perché non è possibile vietare un prodotto che non c'è) e incoerente sotto due profili normativi: da una parte contravviene alla *ratio* del principio di precauzione del Regolamento CE 178/2002, che si applica solo ad alimenti già commercializzati nell'UE e i cui dati preliminari dovrebbero suggerire un potenziale pericolo, dall'altro, impedisce l'importazione di carne coltivata dall'estero, violando l'articolo 34 del Trattato sul funzionamento dell'UE che vieta le restrizioni quantitative alle importazioni tra Stati membri. Inoltre, il Governo Italiano ritardando l'invio della bozza del provvedimento alla Commissione Europea ed altri Paesi dell'UE, ha violato la procedura TRIS, che potrebbe comportare (come verificatosi in passato) l'inapplicabilità della legge. Se le istituzioni europee dovessero approvare la commercializzazione di carne coltivata, come appare sempre più verosimile, l'Italia potrebbe essere sanzionata per violazione del mercato libero europeo ed invitata ad adeguarsi alla normativa comunitaria ed è altrettanto improbabile che la legge venga annullata da un provvedimento dell'UE. C'è da notare infine come la legge vieti solo la carne coltivata di vertebrati, mentre quella di quella di crostacei e cefalopodi, potrebbe essere prodotta in Italia. Come hanno fatto osservare un gruppo di biotecnologi italiani sulla rivista Nature Biotechnology, il provvedimento italiano compromette il progresso scientifico e sociale di questo settore emergente con il rischio di delocalizzare i centri di ricerca. Gli stessi ricercatori propongono una sorta di autoregolamentazione come avvenne ad Asilomar nel 1975 durante la conferenza sul DNA ricombinante che ha portato alla condivisione di un serie di linee guida condivise per l'uso sicuro. La finalità di una seconda Asilomar è anche di coinvolgere nel dibattito scientifico il pubblico e le istituzioni, per aumentarne l'interesse sulla ricerca biomedica e sulle questioni critiche, per costruire un consenso che eviti un divieto, che come è accaduto in passato, potrebbe soffocare questo campo emergente [32].

2. Carne coltivata e religione

Il settore della carne coltivata suscita l'interesse anche all'interno delle comunità religiose. Per entrare nei mercati kosher e halal, la carne coltivata deve rispettare standard e requisiti specifici, compreso il modo in cui il prodotto è stato prodotto e il luogo in cui ha origine. L'Unione Ortodossa, l'autorità di certificazione kosher più grande e influente al mondo, ha di recente certificato come kosher i prodotti a base di

pollo della startup israeliana SuperMeat segnando un passo avanti verso l'accettazione della tecnologia alimentare secondo la legge alimentare ebraica [33]. Secondo le norme kosher, i prodotti a base di carne devono provenire da animali macellati e nulla può essere derivato da una creatura vivente. I prodotti certificati di SuperMeat eludono queste restrizioni coltivando carne a partire da cellule staminali di uova fecondate prima che compaiano macchie di sangue. L'azienda Good Meat ha convocato un gruppo di tre esperti della sharia che hanno esaminato la produzione dell'azienda ed hanno affermato che la carne coltivata può essere halal se, tra gli altri fattori, le cellule da cui viene prodotta la carne provengono da un animale macellato secondo la legge islamica. Anche l'agenzia che regola le certificazioni halal a Singapore ha rilasciato una dichiarazione simile in materia. Attualmente la carne prodotta da Good Meat, che negli Stati Uniti ha ricevuto l'ok al consumo, non soddisfa questo criterio, ma secondo l'azienda ora è più chiara la direzione in cui procedere.



3. Il processo di produzione di carne coltivata

La produzione di carne coltivata sfrutta la tecnologia delle colture cellulari, basata sulla biologia delle cellule staminali in uso nel settore della medicina rigenerativa umana, per rigenerare i tessuti o sostituire le cellule danneggiate o malate, ed ingegneria tissutale-cellulare che consente di coltivare, controllare e manipolare cellule e tessuti al di fuori del corpo animale, secondo forme e funzioni previste [34]. Sono tecnologie applicate da decenni a anche nel settore delle biotecnologie per la produzione di proteine ricombinanti, vaccini e farmaci, come l'insulina. Il processo di produzione di carne coltivata prevede una serie di passaggi chiave ed ogni fase può potenzialmente includere varie sotto-fasi a seconda della fonte e del tipo di prodotto finito. Si inizia con il prelievo di un piccolo campione di tessuto da un animale vivo attraverso una biopsia o da una carcassa (approvvigionamento cellulare) contenente tipicamente tessuto muscolare che è la fonte primaria di carne costituito da un piccolo numero di cellule, come le cellule satellite, che abbiano la capacità di differenziarsi in cellule muscolari. Per rendere il prodotto più simile alla carne tradizionale si possono includere anche tessuti adiposo, connettivo e vascolare nel caso siano presenti linee separate di produzione di questi tessuti. La fase successiva è l'isolamento cellulare: il campione di tessuto raccolto viene sottoposto a digestione enzimatica con la rottura meccanica, rilascio di singole cellule dalla matrice tissutale ed isolamento di quelle desiderate tipicamente rappresentate da quelle muscolari, fibroblasti e adipociti. Le cellule isolate vengono poste in un terreno di coltura o substrato formato da due gruppi di componenti, le cui quantità sono in funzione del metabolismo del tipo di cellula utilizzato. Il primo componente è il mezzo basale contenente una soluzione tamponata di glucosio, amminoacidi, sali inorganici e vitamine idrosolubili fondamentali per la

sopravvivenza delle cellule a cui si aggiungono antibiotici e antimicotici che dovranno essere valutati nel prodotto finito. Il secondo contiene fattori specifici come le proteine ricombinanti, i fattori di crescita o ormoni, lipidi e antiossidanti che consentono il mantenimento, la proliferazione e il differenziamento cellulare. I terreni di coltura tradizionali contengono il siero prelevato dal feto (FBS) dopo la macellazione di vacche e cavalle gravide che per la presenza di fattori di crescita, ormoni e sostanze nutritive supportano la crescita e la proliferazione cellulare. Il suo utilizzo però genera notevoli complicazioni tecniche, tra cui elevati costi, importanti differenze tra batch e ridotta scalabilità, in unione a preoccupazioni legate al benessere animale e alla sicurezza del prodotto finito per il rischio di introduzione di contaminanti. Per tali motivi, sono state inizialmente sviluppate nuove formulazioni a ridotto contenuto di siero, seguite da opzioni senza siero animale (serum-free), le quali contengono fattori di crescita che possono sostituire le funzioni del siero per determinati tipi di linee cellulari. I fattori di crescita più comunemente utilizzati sono il fattore di crescita trasformante beta (TGF- β) e il fattore di crescita dei fibroblasti 2 (bFGF2) costituiti da proteine specializzate che si legano ai recettori cellulari e stimolano le cellule a crescere o differenziarsi e a regolare altre funzioni [35]. Le cellule isolate vengono così coltivate all'interno di un bioreattore (contenitori simili ai fermentatori usati per la produzione di birra, vino, formaggio e yogurt) o di un pallone per coltura cellulare già in uso nell'industria farmaceutica che assicurano condizioni ottimali in un ambiente controllato, dove temperatura, pH e i livelli di ossigeno sono attentamente regolati ed il terreno di coltura regolarmente rifornito per supportare la crescita e la divisione cellulare. Inizialmente, la fase di proliferazione cellulare vede appunto le cellule crescere o in sospensione, o per adesione su microcarrier o per formazione di sferoidi cellulari. I microcarrier sono sfere di polistirene o composti di materiali simili a quelli delle impalcature, preferibilmente food-grade, inseriti nel bioreattore allo scopo di fornire un substrato temporaneo per l'adesione e proliferazione cellulare. Sono i candidati più promettenti per l'upscaling in quanto offrono un ampio rapporto superficie/volume e consentono di avere elevate densità cellulari rispetto alla coltura bidimensionale [36]. Possono essere separati dalle cellule, un'operazione che presenta però costi aggiuntivi e verifiche di sicurezza alimentare per eventuali residui nel prodotto finito, oppure degradati o dissolti durante il processo di produzione o, ancora meglio, resi commestibili utilizzando collagene e chitosani incorporati nel prodotto finito. In quest'ultimo caso funzionano come additivi per i quali occorrerà stabilire un limite soglia. La durata della fase di proliferazione varia a seconda del tipo cellulare ed obiettivi produttivi. Una volta ottenuto un numero sufficiente di cellule queste vengono indotte a differenziarsi in cellule muscolari (differenziazione o maturazione). Questo processo comporta in genere il cambiamento delle condizioni della coltura, con l'alterazione della composizione dei nutrienti o l'applicazione di stimolazione meccanica o elettrica. Durante questa fase, detta di maturazione, le fibre muscolari continuano a crescere e ad allinearsi e il tessuto subisce cambiamenti nella composizione e nella struttura per assomigliare alla carne matura. La struttura del prodotto dipende da durata e condizioni del processo produttivo: durante la differenziazione le cellule staminali o cellule satelliti diventano mioblasti, poi miociti che iniziano a formare minuscole fibre dette miotubi (le unità base delle fibre muscolari) le quali possono ulteriormente organizzarsi in fibre muscolari che si allineano e con specifici metodi di lavorazione degli alimenti (mescolamento, stampaggio) vengono assemblate in strutture tridimensionali per formare il tessuto muscolare scheletrico ed imitare la consistenza e la struttura della carne così come la conosciamo (assemblaggio dei tessuti). Similmente, è possibile anche produrre tessuto adiposo, partendo da cellule pre-adipogeniche e inducendo la maturazione in adipociti sempre tramite cambiamenti nel terreno di coltura e con il supporto di impalcature. La maturazione può richiedere diverse settimane e potrebbe comportare passaggi aggiuntivi per migliorare il sapore, la consistenza e il profilo nutrizionale della carne coltivata. Possono essere utilizzate varie tecniche derivate dall'ingegneria tissutale basate su impalcature o scaffolding. Le

impalcature sono matrici porose tridimensionali che mimano la cito-architettura tridimensionale del muscolo o matrice extracellulare e fungono da supporto per la coltura cellulare, consentendo l'adesione, proliferazione cellulare e differenziamento e al tempo stesso la perfusione continua dei terreni, come avviene nei processi di vascolarizzazione dei tessuti in bioingegneria. Sono costituite da idrogel sintetici biocompatibili come ad esempio gel di fibrina misto con collagene e Matrigel® o gel di agarosio, fibronectina, acido arginilglicilaspartico (RGD) o anche da materiali di origine vegetale (mais), algali (alginato o carragenine) o fungina (chitosano). Ricercatori dell'Università di Bath nel Regno Unito lavorano su una impalcatura naturale, sotto forma di erba decellularizzata, che mantiene la sua naturale topografia striata e supporta l'attaccamento, la proliferazione, l'allineamento e la differenziazione dei mioblasti C2C12 murini, senza la necessità di funzionalizzazione aggiuntiva. Il vantaggio consiste nell'utilizzo di un'impalcatura poco costosa e sostenibile per applicazioni di ingegneria tissutale in grado di influenzare l'allineamento cellulare, una proprietà desiderata per la coltura del muscolo scheletrico e con applicazione alla carne coltivata [37]. Strutture organizzate possono essere ottenute anche tramite tecniche di bioprinting, in cui le cellule sono immerse in un "inchiostro" composto da materiali simili a quanto sopra descritto che viene "stampato" in 3D. Il tessuto assemblato può così maturare e svilupparsi. Raggiunta la maturità desiderata c'è la fase di raccolta e lavorazione che prevedono la rimozione di componenti non muscolari, come i terreni di coltura residui e la lavorazione per creare prodotti finiti pronti per il consumo. È importante notare che i dettagli specifici e le tecniche utilizzate in ogni fase possono variare a seconda dei metodi di produzione e delle tecnologie impiegate dalle diverse aziende o gruppi di ricerca. Il processo di produzione di carne coltivata è illustrato nella figura 3.

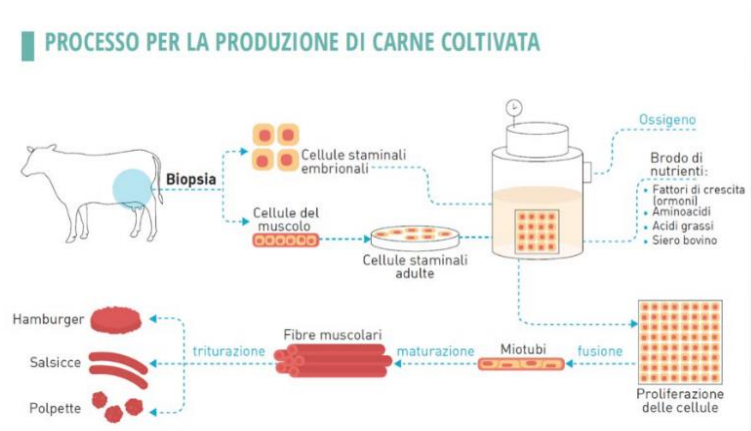
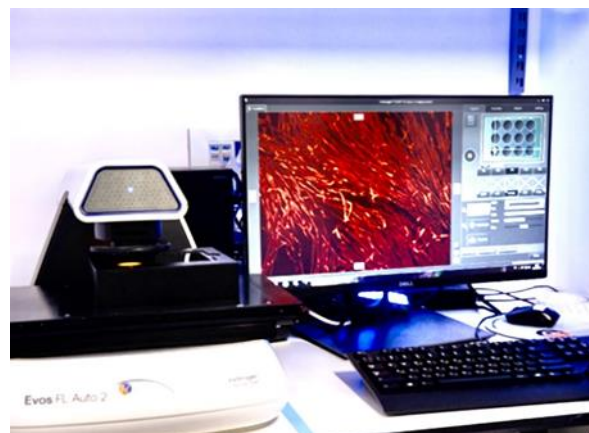


Figura 3. Schema del processo di produzione della carne coltivata.

4. Le fonti cellulari ideali per produrre carne coltivata

Per decenni, aziende come Pfizer Inc. e Johnson & Johnson hanno coltivato grandi volumi di cellule per produrre vaccini, anticorpi monoclonali e altri prodotti bio-terapeutici. Ora l'idea è che potremmo mangiare anche queste cellule. Esistono due possibili fonti cellulari per formare prodotti di agricoltura cellulare mediante l'ingegneria tissutale: le cellule primarie isolate dal tessuto originale o le linee cellulari. Le cellule primarie vengono prelevate dal tessuto animale nativo (preferibilmente) muscolari, o pre-adipogeniche) periodicamente e coltivate. Hanno un numero limitato di divisioni cellulari (circa 50), una soglia definita limite di Hayflick, che richiede biopsie ricorrenti da animali donatori [38]. Le limitazioni legate all'utilizzo delle cellule

primarie includono l'isolamento del tipo cellulare desiderato dal tessuto raccolto, sia per quanto riguarda l'omogeneità che il numero di cellule. E' una procedura tecnicamente impegnativa, costosa, non garantisce un numero sufficiente di cellule e presenta una variabilità tra i campioni con un impatto sul comportamento di crescita, sulla risposta all'ambiente colturale e sulla riproducibilità del processo [39]. Queste cellule vengono prelevate direttamente tramite biopsia da muscolo o organo di animali adulti, vivi o appena macellati o embrioni e coltivate in un terreno ricco di sostanze nutritive e fattori di crescita necessari la moltiplicazione e differenziazione nel tessuto muscolare o adiposo. Le linee cellulari possono essere formate in due modi: attraverso l'induzione (ingegneria genetica, o stimoli chimici o fisici) che può programmare le cellule a farle replicare indefinitamente o selezionando mutazioni spontanee in cui la cellula esprime immortalità e coltivando la popolazione risultante. I vantaggi delle cellule immortalizzate comprendono: maggiore stabilità e consistenza nella coltivazione, maggiore velocità di proliferazione e minor dipendenza dai campioni di tessuto fresco. Lo svantaggio più comune è la perdita di potenziale di differenziamento e la possibile mutazione di geni oncogeni. Le linee cellulari ideali sono quelle con estesa capacità proliferativa, come le cellule staminali embrionali pluripotenti all'interno delle blastocisti che possono auto-rinnovarsi e trasformarsi in qualsiasi tipo di cellula somatica; le cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) che derivano da cellule somatiche adulte riprogrammate; le cellule staminali mesenchimali o cellule staminali adulte quali le cellule satelliti del muscolo bovino situate tra le fibre muscolari. Quest'ultime sono la fonte più ricercata, svolgono un ruolo cruciale nella rigenerazione muscolare e sono responsabili della riparazione e rifornimento del tessuto muscolare grazie alla capacità di differenziarsi in cellule muscolari mature (miociti) e di fondersi insieme per formare le fibre muscolari. Le cellule satelliti possono derivare anche da altre specie animali come il suino, pollame e pesci. E' stato dimostrato che le linee cellulari ricavate dai pesci (es. sgombro atlantico) offrono vantaggi superiori per la coltivazione rispetto a quelle di mammifero in quanto più tolleranti a bassi livelli di ossigeno, ad un ampio intervallo di pH e basse temperature [40].



Il processo di immortalizzazione è stato introdotto nella ricerca medica fin dall'inizio degli anni '50, con la famosa linea cellulare immortale HeLa, e ha consentito ai ricercatori di continuare gli studi senza campioni freschi umani o animali e di portare a scoperte rivoluzionarie nella scienza oncologica e immunologica [41]. Oggi, i vaccini COVID-19 di AstraZeneca Plc e J&J vengono coltivati utilizzando rispettivamente cellule umane immortalizzate di reni e retina. Il processo è molto simile alla produzione di carne coltivata. Le cellule immortali vengono coltivate in un grande tamburo d'acciaio chiamato bioreattore con la produzione di migliaia di kg di massa cellulare. Come sopra accennato, i metodi utilizzati possono basarsi su trasformazioni chimiche, fisiche, virali o genetiche (trasformazione oncogena o genome editing) o immortalizzazione spontanea. La

trasformazione virale si basa sull'integrazione del materiale genetico virale (es. retrovirus o adenovirus) nel DNA della cellula ospite (es. Simian virus 40 o SV40). I geni virali o oncogeni (geni che promuovono la crescita cellulare incontrollata) possono interrompere i normali meccanismi di controllo del ciclo cellulare e consentire la divisione cellulare continua [42]. Un altro metodo genetico consiste nell'attivazione dell'enzima telomerasi reverse transcriptase (TERT) che blocca l'accorciamento dei telomeri del DNA, strutture protettive situate alle estremità dei cromosomi che si accorciano ad ogni divisione cellulare durante le replicazioni. Quando i telomeri diventano troppo corti, le cellule entrano in uno stato di senescenza replicativa e smettono di dividersi. L'uso della telomerasi rende le cellule capaci di crescere indefinitamente. Questo metodo viene spesso utilizzato in combinazione con altre tecniche. L'immortalizzazione indotta geneticamente si basa anche sull'espressione ectopica o l'enzima dependent kinase Cyclin 4 (CDK4) che fornisce il motore per la divisione cellulare. Questo approccio si è dimostrato affidabile nella ricerca medica per le cellule satelliti umane [43] ed è stato proposto per gli animali da reddito [44]. Altre modificazioni genetiche possono comportare l'attivazione di geni che promuovono la crescita o la soppressione di geni coinvolti nella senescenza o nell'apoptosi (morte cellulare programmata). Infine, l'immortalizzazione può talvolta essere ottenuta attraverso la fusione di cellule primarie con cellule immortalizzate o cellule tumorali e trasferimento di immortalizzanti consentendo alle cellule primarie di aggirare la senescenza e continuare a dividersi indefinitamente. L'azienda israeliana Believer Meats, ad esempio, ha pubblicato uno studio sulle cellule di fibroblasti di pollo rese spontaneamente immortali, che garantiscono biomasse elevate all'interno del bioreattore e produzioni annuali di 10.000 tonnellate di carne coltivata, un livello superiore alle decine di tonnellate di altre aziende e con riduzione dei costi [45]. Il Centro per l'agricoltura cellulare della Tufts University negli Stati Uniti ha messo a punto e validato un metodo di coltivazione a fini alimentari di cellule satellite immortalizzate provenienti dal muscolo bovino (iBSCs) che si basa sull'integrazione trasposonica degli enzimi TERT e CDK4, in grado di raggiungere oltre 120 duplicazioni e mantenere la capacità di differenziazione miogenica [46]. Recentemente, la FDA ha pre-autorizzato la carne coltivata di pollo prodotto con fibroblasti immortalizzati mediante l'enzima TERT [47]. L'immortalizzazione potrebbe sollevare preoccupazioni etiche e di sicurezza riguardo al potenziale di crescita cellulare infinito, che è un segno distintivo del tumore o al comportamento cellulare alterato. Nonostante il consenso scientifico informale sulla sicurezza delle cellule immortalizzate, non esistono studi sanitari a lungo termine che lo dimostrino. Pertanto, sono in atto rigidi schemi normativi e valutazioni di sicurezza che garantiscano che le cellule immortalizzate utilizzate nella produzione di carne coltivata siano sicure e non comportino rischi per la salute. La scelta tra l'utilizzo di cellule satellite o linee cellulari immortalizzate nella produzione di carne coltivata dipende da vari fattori, tra cui scalabilità, efficienza e considerazioni normative. Anche altre start-up stanno escludendo le cellule immortalizzate dalle loro ricette, come la Aleph Farms Ltd. che utilizza cellule staminali embrionali naturalmente immortali per cercare di evitare quello che il CEO Didier Toubia definisce un potenziale problema di "accettazione da parte dei consumatori". Questi sviluppi suggeriscono che le cellule geneticamente immortalizzate avranno un ruolo importante per il futuro della carne coltivata [48].

5. Pericoli potenziali associati alla carne coltivata

Come per qualsiasi processo di produzione di alimenti anche per la carne coltivata la sicurezza va declinata in rapporto ai pericoli microbiologici, chimici, di stabilità, qualità e identità delle linee cellulari e ai relativi rischi. Essendo una settore non ancora sviluppato su scala industriale, è caratterizzato da un elevato livello di

incertezza, che può essere ridotto sulla base di dati disponibili e studi di valutazione del rischio. Salvo alcuni paesi che hanno predisposto regolamenti che affrontano gli aspetti di sicurezza alimentare (es. Singapore, Stati Uniti, Israele, Qatar), il processo autorizzativo e normativo della carne coltivata si presenta lungo e complesso in quanto occorrono più dati e prove sulla sicurezza e qualità e la definizione dei requisiti di etichettatura. Per poter affrontare le sfide tecnologiche del settore ed elaborare metodi di valutazione del rischio, l'EFSA ha organizzato un Colloquio Scientifico dal titolo 'Cell culture-derived foods and food ingredients' e riunito a Bruxelles ricercatori, funzionari di agenzie europee, operatori e gruppi di consumatori. L'evento ha permesso di fare il punto su concetti e tecnologie di produzione di alimenti e ingredienti alimentari a partire da colture cellulari, fermentazione di precisione, ingredienti alimentari prodotti da cellule microbiche ingegnerizzate, pericoli di sicurezza alimentare ed aspetti metodologici dei sistemi di valutazione del rischio [49]. L'EFSA ha stimato che non prima di cinque anni sarà possibile completare l'iter autorizzativo in Europa per commercializzare il primo prodotto a base di carne coltivata. Considerata la potenziale varietà di processi e prodotti c'è necessità di definire nuovi parametri e target per valutare la composizione, i materiali di ingresso e contaminanti, sviluppare nuovi metodi analitici o adattare approcci già esistenti per le carni convenzionali, nonché condurre studi di shelf-life e disporre di database simili a quelli utilizzati nei settori alimentari e farmaceutico [50]. Per il prossimo futuro si potrà prevedere l'intervento del Codex per sviluppare linee guida con standard di sicurezza e qualità internazionali. La FAO/WHO hanno stabilito che in virtù di procedure rigide di controllo del processo produttivo, i rischi di sicurezza alimentare della carne coltivata associati alla presenza di residui di antibiotici, contaminanti microbiologici inclusi e patogeni zoonotici sono sostanzialmente simili a quella delle produzioni tradizionali o eventualmente inferiori [6]. Nel rapporto congiunto vengono identificati 53 pericoli potenzialmente connessi con quattro fasi della produzione di carne coltivata, i cui rischi devono valutati sulla base di evidenze della loro rilevanza sulla popolazione esposta (vedi figura 4).

	Transmission of zoonotic infectious diseases	Residues and by-products	Novel inputs	Biological contamination
1. Cell selection	X	X		X
2. Production	X	X	X	X
3. Harvesting		X	X	X
4. Food processing		X	X	X

Fig.4 Pericoli riscontrabili durante la produzione di carne sintetica (FAO/WHO, 2023).

6.1 Pericoli microbiologici

I rischi microbiologici nella produzione di carne coltivata sono legati a contaminazione batterica, virale o fungina e/o contaminazione crociata durante tutto il processo produttivo, come indicato in figura 3. Il primo passo per stabilire la sicurezza microbiologica delle cellule di origine animale è valutare la presenza di batteri patogeni come Salmonella, Campylobacter, E coli, prioni, virus o funghi dannosi e l'adozione di misure igieniche rigorose, tecniche di sterilizzazione, condizioni asettiche e monitoraggio. Se la carne coltivata viene prodotta da cellule di origine animale ottenute tramite biopsia muscolare, occorre valutare la storia clinica degli animali donatori e lo stato sanitario degli allevamenti di provenienza (es. vaccinazioni, trattamenti) con approcci diversificati a seconda della specie. Gli agenti patogeni non risparmiano la carne coltivata, in

particolare nelle fasi produttive a valle (trasformazione alimentare e stoccaggio), mentre i processi di produzione a monte (coltura cellulare) possono introdurre patogeni non comuni nella produzione alimentare convenzionale, tra cui i micoplasmi, a partire da reagenti, aria e apparecchiature contaminati. Possiamo affermare che i rischi di contaminazione (batterica o fungina) derivano principalmente dal processo (ingredienti, strumentazione, operatori) e meno dalla linea cellulare in sé. C'è poi il rischio di contaminazione virale a partire dalle fonti cellulari, da componenti di origine animale come i terreni contenenti siero fetale bovino, cellule ed altri componenti derivati, che rende le cellule vulnerabili in quanto non dispongono di un sistema protettivo immunitario presente invece nell'organismo animale. Sebbene la maggior parte dei virus siano specifici per l'ospite, possono mutare e infettare diversi ospiti. Nell'eventualità di utilizzo di animali esotici per la produzione di carne coltivata si potrebbe ipotizzare il rischio di trasferimento di un virus sconosciuto dalla coltura cellulare all'uomo. Riguardo ai metodi di prevenzione e mitigazione dei pericoli, le colture cellulari dovrebbero essere sottoposte a screening regolari in quanto se è vero che vengono tradizionalmente gestite in condizioni asettiche con minor rischio di contaminazione, i livelli produttivi industriali non offrono le stesse garanzie. La metagenomica si rivela utile per identificare e caratterizzare il microbiota o un'ampia selezione di agenti patogeni. La scelta del metodo di rilevamento si basa sul target da identificare, carica microbica, velocità di rilevamento, sensibilità del metodo e matrice alimentare [51]. Una volta definite le fonti di contaminazione sono sufficienti i sistemi di gestione del rischio come HACCP e GMP già applicati alle carni convenzionali. Per ridurre al minimo il rischio di contaminazione crociata tra lotti o linee cellulari diversi, occorre assicurare un'adeguata separazione e isolamento delle stesse e delle aree di produzione. L'industria sta sviluppando soluzioni per mantenere la sterilità durante il processo, che includono per esempio peptidi antimicrobici sintetici (studiati anche come conservanti nei cibi). A differenza della carne convenzionale, per la valutazione del rischio microbiologico della carne coltivata, ci sono condizioni che non consentono di definire in modo certo il livello di rischio, quali la mancanza di accesso alle informazioni sui campioni, la carenza di dati di processo, di dati scientifici pubblici e di standardizzazione o convalida dei test esistenti. Questo gap impone la condivisione di banche dati dei settori pubblico e privato ed una maggiore collaborazione tra industria, gruppi di ricerca e mondo accademico. Ciò migliorerebbe il processo di identificazione dei pericoli, la valutazione del rischio e la definizione di schemi normativi e standard efficienti, elementi critici per costruire la fiducia dei consumatori [52].



6.2 Pericoli chimici (antibiotici, tossine, allergeni)

Analogamente ai pericoli microbiologici, l'individuazione e valutazione dei pericoli chimici delle cellule e del prodotto finito richiedono la disponibilità di informazioni complete sui materiali e componenti (es. certificati di analisi) utilizzati in ciascuna fase. I pericoli chimici potrebbero derivare dai terreni di coltura e dagli additivi o essere introdotti nella biomassa nelle fasi di coltura, raccolta o lavorazione post-raccolta. Per tali ragioni

dovrebbero essere garantiti l'approvvigionamento di ingredienti di alta qualità e l'assenza di contaminanti chimici, come antibiotici, ormoni o metalli pesanti. Sono altresì importanti un'attenta selezione e sperimentazione degli additivi, come i fattori di crescita o i materiali che compongono le impalcature. Collagene e molecole bioattive (es. ormoni o fattori di crescita) possono essere presenti nella carne convenzionale, mentre è nuovo il loro uso nella produzione di carne coltivata come coadiuvanti tecnologici o additivi alimentari. Per le molecole bioattive occorrerà valutare la loro attività nei prodotti finiti e dopo il consumo o l'inattivazione durante la lavorazione, cottura o digestione. Per alcune molecole sono disponibili i dati ricavati dalla letteratura esistente che indicano una soglia sicura per il consumo: è il caso del fattore di crescita insulino-simile IGF-1 bovino che può essere utilizzato per la produzione di carne coltivata in quanto già conosciuto nei prodotti animali convenzionali [53]. Tuttavia, come ha fatto notare il Comitato congiunto di esperti FAO/WHO sugli additivi alimentari (JECFA, 1990) l'IGF-1 bovino è strutturalmente identico all'IGF-1 umano ed è probabile che abbia un effetto simile nell'uomo [54]. Tra le sostanze esogene senza precedenti di utilizzo negli alimenti, ci sono ad esempio crioprotettori o la molecola SB 203580, un inibitore altamente specifico che svolge un ruolo cruciale nella differenziazione e proliferazione delle cellule staminali nelle produzioni industriali di carne coltivata [55]. Per valutare la sicurezza dei contaminanti chimici possono essere impiegati studi tradizionali basati sul concetto di soglia di preoccupazione tossicologica (Threshold of toxicological concern-TTC) [56] o implementare l'approccio *read-across*, un metodo che fornisce indicazioni su sostanze non ben caratterizzate partendo da sostanze simili ma note. Alcuni dei materiali utilizzati nell'ingegneria dei tessuti sono già autorizzati per le applicazioni cliniche, mentre mancano i dati di sicurezza in caso di livelli di consumo elevati. Per molte molecole bioattive non ci sono studi sul loro uso negli alimenti e le informazioni tossicologiche disponibili o valutazione del rischio su alcuni effetti potenziali di tipo autoimmunitario. Un esempio è il rosso fenolo (fenolfaleina), un additivo comunemente utilizzato come indicatore di pH nei terreni di colture cellulari, ma non autorizzato come additivo alimentare a causa di reazioni allergiche e di una potenziale cancerogenicità per l'uomo [57]. I microcarrier, se riutilizzabili potrebbero introdurre nel processo contaminanti chimici attraverso i residui dei processi di sterilizzazione e/o degradazione nel tempo (es. tossicità, digeribilità) o come migrazione nel prodotto dal materiale di contatto e modifica della composizione della biomassa raccolta. Per alcuni nuovi materiali, ad esempio i biomateriali polimerici costituenti le impalcature, non ci sono informazioni chiare sulla potenziale tossicità o allergenicità associate ai prodotti di degradazione [58]. Il collagene invece, spesso utilizzato per la generazione di impalcature, è ricco dell'aminoacido glicina che può provocare effetti collaterali per il consumatore. Il potenziale pericolo allergenico può derivare anche da nuove proteine risultato di espressione genetica, in questi casi gli studi di *read-across* o altri test *in vitro/in silico* possono fornire informazioni sulla predizione allergenica. Per gli aspetti tossicologico-nutrizionali gli studi sulla tossicità animale dei 90 giorni (90 D) dovrebbero essere ridotti o evitati ed utilizzati invece approcci come l'analisi omica mirata dei terreni successiva alla raccolta della biomassa ed altre metodologie come i nuovi approcci metodologici (NAMs) senza l'uso di animali che facilitano la valutazione tossicologica e allergenica dei componenti, materiali e sottoprodotti. Infine, la presenza di allergeni non presenti nei prodotti convenzionali di origine animale può porre un problema di etichettatura. Altri problemi per la sicurezza sono legati al riciclo di terreni o produzioni ad elevata densità cellulare che possono causare un accumulo di componenti o di sottoprodotti metabolici come l'ammoniaca e lattati, cataboliti tossici in grado di rallentare la crescita cellulare anche a basse concentrazioni, come avviene nella produzione di biofarmaci. L'accumulo riguarda anche i residui di eventuali prodotti chimici o sostanze utilizzate durante il processo di produzione, come disinfettanti,

detergenti o solventi, che dovrebbero essere scelti con cura e adeguatamente rimossi per prevenirne la presenza nel prodotto finito. Nel caso degli antibiotici, penicillina, streptomina e gentamicina sono comunemente usati nelle colture cellulari per prevenire l'infezione. Il loro utilizzo nelle carni coltivate è spesso limitato alla fase di sviluppo delle linee cellulari, dopodiché si prevede una loro diluizione a livelli sicuri. Se utilizzati invece nelle fasi successive del processo, sono indicatori di controlli insufficienti o carenti dei contaminanti microbici, con il rischio del superamento dei livelli soglia nel prodotto finito. È necessario comprendere il rischio di esposizione ai residui di antibiotici ma anche fungicidi. Questo aspetto richiede l'elaborazione da parte delle agenzie di regolamentazione di linee guida sull'uso sicuro degli antibiotici (es. dati tossicologici, metodi analitici) sulla base dell'esperienza acquisita per le carni convenzionali. Anche i bioreattori dovrebbero essere realizzati con materiali sicuri e non reattivi con i terreni di coltura o le cellule. Per la gestione dei pericoli chimici, gli organismi regolatori e le organizzazioni di settore devono promuovere e sviluppare linee guida e standard di sicurezza alimentare e di qualità durante l'intero processo produttivo. Nella tabella 1 sono riassunti gli elementi e condizioni che richiedono ulteriore valutazione del rischio.

Terreni utilizzati per la crescita cellulare	diversa composizione e con componenti derivati da varie fonti alternative all'uso del siero animale fetale
Componenti e loro destino nel processo	valutazione di sostanze presenti nelle fasi iniziali del processo ed eventualmente assenti o presenti in concentrazioni molto basse in quelle finali o nel raccolto della biomassa
	fasi del processo che garantiscono la rimozione di sostanze indesiderate o non necessariamente destinate alla produzione alimentare (es. fattori di crescita, antimicrobici)
	presenza di molecole che inducono la differenziazione cellulare (es. naturali presenti negli animali o composti usati come fattori di stress chimico) che possono condizionare il comportamento delle cellule e/o attivare <i>pathways</i> di espressione di cellule dormienti
	introduzione di potenziale nuovi pericoli/rischi legati alla produzione su scala industriale in combinazione con gli sforzi di riduzione dei costi: es riciclo dei materiali in ingresso e purificazione dei terreni, utilizzo degli antimicrobici e possibili alternative
	impalcature riutilizzabili che potrebbero introdurre contaminanti chimici nel processo
	residui dei processi di sterilizzazione e/o degradazione nel tempo (es. tossicità, allergenicità, digeribilità)
	migrazione nel prodotto dal materiale di contatto che potrebbe effettivamente influire sulla composizione della biomassa raccolta.

Tabella 1- Elementi e condizioni di produzione di carne coltivata che richiedono ulteriore valutazione del rischio.

Una fase critica nel processo di produzione di carne coltivata è la purificazione che prevede la riduzione/rimozione delle endotossine, note anche come lipopolisaccaridi componenti la membrana esterna dei batteri Gram-negativi, ubiquitari nell'ambiente e nell'acqua di rubinetto. Le endotossine vengono rilasciate durante la crescita batterica ed in grandi quantità con l'inattivazione. La loro presenza nelle colture cellulari può avere un'ampia varietà di effetti: ad esempio è emerso come ad una concentrazione di appena 1 ng/ml i tassi di successo della gravidanza si riducono di 3-4 volte durante la fecondazione in vitro di ovociti [59]. La fase di purificazione incide molto in termini di risorse ed impatto ambientale, soprattutto nel caso di livelli produttivi elevati come quelli associati all'utilizzo di grossi bioreattori.

6.3 Pericoli mutageni

Per mutagenesi si intende un processo di induzione di cambiamenti nella sequenza del DNA di un organismo. Ciò è rilevante per le linee cellulari utilizzate per la produzione di carne coltivata in quanto uno dei requisiti è il mantenimento nel tempo delle caratteristiche genetiche e fisiologiche in grado di assicurare prestazioni

produttive uniformi. Per assicurare estese proliferazioni e al contempo eliminare la variabilità dei lotti di linee cellulari, si utilizzano le cellule staminali pluripotenti o cellule rese immortali. Per quanto riguarda la stabilità genetica e metabolica sia gli stimoli fisici e biochimici durante la coltura che i tempi prolungati con un numero alto di divisioni cellulari, possono causare mutazioni nel DNA e selezione di cellule con caratteristiche di crescita alterate. Dopo diverse subcolture e passaggi, le linee cellulari possono essere divergenti rispetto alla sequenza genetica della linea cellulare originale ed esprimere una morfologia e un comportamento cellulare diversi. Questa condizione, definita di shift o deriva (epi)genetica, genera il rischio fenotipico di nuove espressioni cellulari e sintesi di metaboliti o allergeni. La stabilità genetica può essere compromessa dalla presenza di micoplasmi che possono infettare le linee cellulari con una incidenza tra il 5% e il 35% sia con una singola specie che più specie. I micoplasmi non causano torbidità nella coltura, ma possono modificare i tassi di crescita, rallentandoli, alterare il metabolismo e la fisiologia cellulare e causare aberrazioni cromosomiche [60]. Per ciò che riguarda il rischio di infezione per i consumatori, ad oggi non ci sono dati che consentono di fare una valutazione del rischio. Sicuramente il rischio di modificazioni genetiche è un elemento di preoccupazione, ma occorre ricordare come la produzione di carne coltivata non comporti l'introduzione deliberata di agenti mutageni o modificazioni genetiche. Inoltre, eventuali cellule precancerose o cancerose in quanto non umane, non possono replicare all'interno del corpo umano e sulla base di scarse evidenze riferite ad alimenti OGM [61] è altamente improbabile sia l'integrazione del DNA delle cellule nel genoma del consumatore che il trasferimento orizzontale del DNA nei batteri intestinali [62]. FAO/WHO respingono le preoccupazioni su un possibile rischio di tumori e definisce altamente improbabile la sequenza di eventi che consentono a cellule satellite bovine pluripotente o immortalizzate, potenzialmente cancerogene o precancerogene, di sopravvivere alle fasi di raccolta, maturazione/stoccaggio, cottura e digestione, superare la parete intestinale e formare tumori dopo il consumo [6]. Il rischio non è esclusivo degli alimenti a base cellulare ma presente nelle procedure di riproduzione o clonazione convenzionali e terapie cellulari e industrie biosimilari. Inoltre materiale genetico e prodotti di degradazione sono già presenti in alimenti convenzionali e non sono pericolosi. La carne coltivata viene prodotta in un ambiente di laboratorio controllato dove le condizioni di crescita, l'apporto di nutrienti e i terreni di coltura sono attentamente regolati per ridurre al minimo il rischio che fattori esterni, come la selezione naturale o le pressioni ambientali, possano influenzare i cambiamenti genetici all'interno della popolazione cellulare. La presenza potenziale di oncogeni nelle cellule immortalizzate tramite processi spontanei o di ingegneria genetica, sebbene venga ritenuta un rischio relativamente basso rispetto ai metodi tradizionali di modificazione genetica, rappresenta oggi una sfida per i ricercatori e richiede una costante attività di monitoraggio come per qualsiasi tecnologia emergente. Si tratta di un settore che da un lato impegna i ricercatori e gli organismi regolatori nella valutazione della stabilità genetica e sicurezza per i consumatori, dall'altro i produttori nel monitoraggio di rischi associati alla deriva genetica o ai cambiamenti genetici involontari. E' fondamentale inoltre la creazione e mantenimento di banche cellulari (biorepository) per le quali possono essere utilizzate la tecnologia e le linee guida in uso nel settore farmaceutico, opportunamente adattate e standardizzate per la produzione alimentare. La ricerca futura dovrà focalizzarsi sulle seguenti attività: - screening a livello genomico di mutazioni o cambiamenti cellulari (es. valutazione della stabilità genetica e fenotipica mediante tecniche molecolari come il cariotipo), proteomico o metabolomico per la sintesi di metaboliti pericolosi o allergeni; - controlli di qualità delle banche contenenti linee cellulari crioconservate per mitigare il rischio di deriva genetica e di presenza di virus, batteri, lieviti e micoplasmi; sviluppo di metodi specifici; - definizione dei limiti di sicurezza dei passaggi in coltura; definizione di parametri che consentono di monitorare la stabilità cellulare; - creazione e condivisione di

database accessibili (democratizzazione delle linee cellulari), che generino informazioni sul potenziale di deriva genetica. Tutte attività che definiscono i requisiti di sicurezza di un prodotto in rapporto alle caratteristiche di identità (es. tipo di cellule), deriva genetica, fenotipo cellulare, proteine espresse e composizione.



6. Il profilo nutrizionale

Se il regolamento (CE) 2015/2283 stabilisce che i *novel food* non dovrebbero essere svantaggiati dal punto di vista nutrizionale, il successo della carne coltivata dipenderà principalmente dal grado di somiglianza/imitazione con quella convenzionale rispetto, sia agli attributi organolettici come sapore, aspetto, colore, consistenza, succosità, che svolgono un ruolo importante per l'accettazione da parte del consumatore, sia nutrizionali determinati anche dalla composizione dei terreni ed utilizzo di nutrienti da parte delle cellule nel corso del processo. Sulla base dello stato dell'arte dei processi produttivi e considerato che l'ambiente delle cellule in coltura e il loro stato di differenziazione differiscono da quello delle cellule contenute nella carne, si può dedurre che attualmente la carne coltivata differisce in modo significativo da quella tradizionale nelle sue proprietà tecnologiche, sensoriali e nutrizionali, come ad esempio il profilo aminoacidico e digeribilità. Attualmente mancano prototipi di carne coltivata disponibili per una valutazione tecnologica, sensoriale (consistenza, colore, sapore e nutrizionale indipendente ed occorrono ulteriori ricerche prima che la sua composizione possa assomigliare a quella tradizionale. Uno delle sfide tecnologiche per la produzione di carne coltivata completamente strutturata è la mancanza di alcuni passaggi critici del processo *post-mortem* che avvengono durante la conversione del muscolo in carne e che hanno effetti importanti sugli attributi organolettici della carne, come il calo del pH dovuto alla glicolisi *post-mortem*, il *rigor mortis*, e la sua risoluzione, l'attivazione della caplaina, e la maturazione [63]. Per migliorare la qualità tecno-funzionale delle proteine della carne potrebbero essere necessaria la stimolazione elettrica e/o meccanica, una soluzione che soprattutto su larga scala richiederà la valutazione della fattibilità tecnologica ed economica inclusa l'impronta ambientale [64]. Inoltre oltre alle fibre muscolari, la carne convenzionale comprende vari altri tessuti come tessuto adiposo, tessuto nervoso, tessuto epiteliale e tessuti circolatori in varie concentrazioni. Nella carne coltivata questi tessuti attualmente mancano. Sono attualmente in corso lavori di ricerca in tutto il mondo basati sulla co-coltura di mioblasti con fibroblasti e condrociti (per lo sviluppo del tessuto connettivo), cellule endoteliali (per lo sviluppo del sistema circolatorio/vascolarizzazione e adipociti (tessuto adiposo) responsabili del colore, consistenza, succosità e sapore della carne. Per assicurare lo stesso colore rosso c'è l'alternativa dell'incorporazione durante la coltura dell'eme di origine vegetale e fortificazione con il ferro. Le differenze esistenti di composizione tra alimenti derivati da colture cellulari e

alimenti convenzionali possono essere superate e/o migliorate con la semplice aggiunta di ingredienti testurizzanti, coloranti, aromi e sostanze nutritive al fine di rimediare alle proprietà sensoriali e nutrizionali. Ad esempio il profilo nutrizionale può essere migliorato riducendo il contenuto in grassi saturi o aggiungendo la vitamina B12 (fortificazione), vitamina D, ferro [65]. Le ricerche sui consumi a lungo termine potranno eventualmente segnalare esiti nutrizionali avversi come carenze o eccesso di vitamine. In assenza di un processo di produzione definito e apertamente comunicato, è attualmente impossibile valutare tutte le potenziali problematiche legate agli aspetti sensoriali e al valore nutrizionale dei prodotti a base di carne coltivata che entreranno sul mercato nei prossimi anni. Tutti gli aspetti di sicurezza e qualità richiederanno l'elaborazione di criteri e metodi di analisi specifici e parametri nutrizionali anche ricorrendo al Codex General Standard per gli additivi alimentari o standard di identità.

7. Efficienza energetica ed impatto ambientale

I sistemi di allevamento intensivo legati al comparto carne (soprattutto quella rossa) sono processi ad alta intensità energetica e a causa di enormi quantità di terreno per il pascolo, produzione di mangimi, infrastrutture, acqua potabile e pulizia, sono fortemente impattanti in termini di emissioni climalteranti e non possono più essere considerati sostenibili ed efficienti. Più di tre quarti dei terreni agricoli mondiali sono utilizzati per l'allevamento, per produrre solo il 18% delle calorie che consumiamo a livello globale [66]. Inoltre, secondo la FAO, l'allevamento ha un impatto pesante sull'ambiente, contribuendo al 14,5% delle emissioni di gas serra antropogeniche, principalmente attraverso il metano rilasciato dagli animali e l'anidride carbonica emessa durante la produzione e trasporto dei mangimi [67]. Il metano chiamato è chiamato super gas serra in quanto intrappola il calore nella atmosfera 84 volte più efficacemente dell'anidride carbonica, ma persiste nell'atmosfera per un tempo molto più breve. La carne la carne è anche responsabile di quasi il 60% di tutte le emissioni di gas serra derivanti dalla produzione alimentare a livello globale [68]. Diversamente, la carne coltivata ha il potenziale di emettere meno gas serra, richiede meno terreno e acqua e viene prodotta in ambienti controllati costituiti da laboratori o bioreattori per fornire i nutrienti necessari per la crescita delle cellule. Inoltre, riduce l'utilizzo dei mangimi di mais o soia necessari per nutrire gli animali e le risorse significative per la coltivazione, il trasporto e la lavorazione, contribuendo anche alla riduzione della deforestazione. Negli ultimi anni sono state sviluppate le conoscenze volte a migliorare l'efficienza energetica e la sostenibilità della produzione di carne coltivata ma sono necessari studi più approfonditi sulla sostenibilità e sull'impatto ambientale legati alla produzione su scala industriale. I critici della carne coltivata sostengono che i laboratori di coltura cellulare sono energivori e, se alimentati da combustibili fossili, hanno un'impronta di carbonio maggiore rispetto alla produzione della carne convenzionale. Per ottenere stime preliminari dell'energia e delle emissioni di gas a effetto serra associati alla produzione di carne coltivata, vengono condotti studi di valutazione del ciclo di vita (Life cycle assessment o LCA) nelle diverse fasi produttive, partendo da ipotesi riguardanti la progettazione dei bioreattori, le materie prime, la composizione e la quantità dei terreni nutritivi con differenze significative tra le diverse tipologie di carni [69][70]. La valutazione LCA può aiutare a identificare le aree con elevate emissioni di carbonio e guidare gli sforzi per ridurre puntando su fasi specifiche della produzione con maggiore impatto ambientale. Lo studio TEA (Tecno-Economic Assessment) condotto nel 2021 da CE Delft, ha stimato i costi futuri di produzione della carne coltivata. L'analisi mostra come gli attuali costi di produzione della carne coltivata sono superiori di un ordine di grandezza da 10 a 100 come valori di riferimento ai prodotti a base di carne tradizionali, a seconda dei requisiti per i componenti dei terreni,

in particolare il prezzo dei fattori di crescita e delle proteine ricombinanti [71]. Tuttavia, con il superamento di una serie di barriere tecniche ed economiche e la combinazione delle riduzioni ottenibili per le diverse fasi produttive (es. costi delle apparecchiature e reattori di perfusione) è possibile ottenere una riduzione del prezzo di produzione di carne coltivata di 4.000 volte: da oltre 10.000 dollari al kg a circa 2,50 nei prossimi nove anni [72]. Le critiche all'analisi segnalano previsioni dei costi non realistiche, aspetti chiave del processo di produzione non ben definiti, sottovalutazione della spesa e complessità della costruzione di una struttura adeguata [73]. I risultati di alcuni studi LCA su cui pesano livelli elevati di incertezza sono stati analizzati da CE Delft, GFI e GAIA in una recente pubblicazione [74] che utilizza anche i risultati del precedente studio TEA del 2021. Lo studio considera diversi fattori di riduzione dei costi come l'efficienza energetica, la selezione delle fonti energetiche, l'uso efficiente dei terreni e la collaborazione dei soggetti della filiera di approvvigionamento. Sebbene vengano fornite stime prudenti che considerano livelli elevati di consumo energetico per il raffreddamento dei bioreattori che gli studi precedenti non avevano considerato, e l'incertezza nel processo di produzione, i risultati indicano che, rispetto alle carni convenzionali, la carne coltivata (bovino, suino, pollo) presenta vantaggi ambientali, utilizza meno terreno e produce meno emissioni. Inoltre quando si utilizza energia rinnovabile l'impronta di carbonio si riduce notevolmente rispetto agli ambiziosi benchmark di produzione della carne bovina convenzionale (riduzione del 92%) e suino (44%) e paragonabile nel caso di carni di pollame (3%). I risultati, più attendibili, in quanto comprendono le spese energetiche, indicano che il valore oscilla tra 13,6 kg di CO² per kg di prodotto artificiale in caso di utilizzo di energia convenzionale, e 2,5 kg di CO² in caso di utilizzo di energie rinnovabili. Per le tre specie, bovino, suino e pollame, si riduce oltre la metà l'uso del suolo e dell'acqua. Il risparmio del suolo in virtù dei terreni che potrebbero essere liberati ed utilizzati per il rimboschimento può mitigare i cambiamenti climatici (consente alla natura di rigenerarsi e assorbire più anidride carbonica), sostenere la biodiversità e fornire benefici sociali e ambientali. Le emissioni per kg di proteine di carne coltivata potrebbero essere addirittura inferiori a quelle delle proteine vegetali e degli insetti [75]. Secondo studi più recenti, solo il consumo di elettricità è paragonabile (e comunque inferiore) a quello necessario per allevare polli, ma tutti gli altri indici di impatto ambientale (suolo, acqua, emissioni, liquami) sono stabilmente attestati attorno a -80/-90% rispetto agli allevamenti tradizionali. Da una ricerca recente condotta presso l'Università di Bath nel Regno Unito è emerso che manipolando i fattori di crescita e le condizioni nutrizionali di cellule staminali di suini e bovini è possibile ottimizzare la crescita e lo sviluppo delle cellule muscolari ed aumentare in modo significativo la resa della carne coltivata con consistenza e gusto paragonabili a quelli della carne prodotta convenzionalmente. I ricercatori hanno sperimentato diversi fattori di crescita e nutrienti ed esplorato l'uso di scaffold o impalcature e bioreattori per supportare la crescita del tessuto muscolare con risultati consistenti in una impronta di carbonio significativamente inferiore rispetto all'allevamento tradizionale. Ma ci sono anche dati discordanti. Secondo uno studio del 2019 la carne coltivata a primo impatto non è climaticamente superiore a quella convenzionale: in alcuni casi e a lungo termine l'allevamento causa molto meno riscaldamento, poiché le emissioni di metano non si accumulano a differenza dell'anidride carbonica derivante dalla carne coltivata, che persiste e si accumula anche con un consumo ridotto [76]. Fa eco uno studio in pre-print di LCA dell'Università di Davis in California che utilizza modelli di stima econometrici TEA molto più accurati di quelli impiegati nelle precedenti pubblicazioni con una valutazione decisamente superiore dell'impatto della carne artificiale sull'ambiente [77]. Rispetto alle precedenti analisi lo studio rileva che l'inclusione del processo di purificazione delle endotossine e raffinazione dei terreni di coltura, non analoghe a quella dell'industria farmaceutica, costituisce una voce di costo economico e ambientale rilevante che può compromettere la sostenibilità futura con livelli di emissione che vanno da un minimo di 246 a un massimo di 1.508 di CO² e per

kg di prodotto, da 4 a 22 volte superiore alla carne convenzionale riferita a emissioni per kg di carne bovina disossata, libera da grasso, con aggiunta di frattaglie. Un lavoro del 2015 giunge alle stesse conclusioni: la carne coltivata ha un'impronta di carbonio circa cinque volte superiore a quella della carne di pollo e dieci volte superiore rispetto alle carni lavorate a base vegetale [78]. Attualmente, sulle voci di costo per la produzione di carne coltivata, pesano i terreni di coltura cellulare per la presenza dei fattori di crescita e proteine ricombinanti che servono una varietà di funzioni critiche nel metabolismo, trasporto e apporto di nutrienti e altre macromolecole e controllo delle attività cellulari. I terreni di coltura incidono in modo significativo sul potenziale di riscaldamento globale complessivo (GWP) e sui costi di produzione di carne coltivata. Si stima che il loro contributo al costo finale della carne coltivata potrebbe essere del 55–95% [79]. Di recente per un sistema di produzione di carne coltivata di Zebra fish è stato proposto un approccio basato sull'intelligenza artificiale per ottimizzare contemporaneamente il GWP, il costo e il tasso di crescita cellulare con una formulazione di terreni di coltura a siero ridotto [80]. Tra i principali fattori di crescita e proteine ricombinanti troviamo: il fattore di crescita dei fibroblasti 2 (FGF2 o FGF basico), il fattore di crescita epidermico (EGF), il fattore di crescita insulino-simile 1 (IGF1), la neuregulina 1 (NRG1), il fattore di crescita trasformante beta (TGF β 1 o β 3), subunità B del fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGFB), albumina e transferrina. L'albumina e la transferrina sono proteine del plasma sanguigno che svolgono un ruolo importante nel trasporto e nell'erogazione di nutrienti e altre macromolecole. Le altre proteine sono fattori di crescita canonici che controllano le funzioni cellulari attraverso vie di trasduzione del segnale. Le forniture attuali dei fattori di crescita possono costare migliaia di dollari al grammo perché prodotti di nicchia realizzati in piccole quantità e secondo rigidi standard farmaceutici. I fattori di crescita ricombinanti, come il fattore di crescita insulino-simile (IGF) o il fattore di crescita epidermico (EGF) vengono prodotti mediante tecniche biotecnologiche per stimolare la proliferazione cellulare e renderle simili alle molecole di segnalazione naturali presenti nel siero fetale bovino. Il fattore di crescita TGF- β , ad esempio ha un prezzo di diversi milioni di dollari al grammo, mentre l'insulina e transferrine proteine ricombinanti 1000 dollari/grammo [81]. Tuttavia, grazie alle attuali innovazioni tecnologiche è possibile sintetizzare prodotti meno costosi e più efficaci. Il costo più basso in assoluto per la produzione dei fattori di crescita può arrivare a 0,10 dollari al grammo. Riducendo il costo di questi input, quello della carne coltivata può scendere di quasi il 90% [82]. Un recente rapporto di GFI fornisce alcune indicazioni per superare queste ostacoli attraverso il modellamento delle quantità di fattori di crescita specifici e proteine ricombinanti necessari per sostenere lo sviluppo dell'industria della carne coltivata. Sulla base dei calcoli effettuati, sostituire una frazione dell'1% del mercato globale di carne convenzionale con carne coltivata potrebbe richiedere milioni di chilogrammi di proteina ricombinante dell'albumina, un volume di gran lunga superiore ai volumi attuali di produzione per la ricerca biomedica e industria farmaceutica e con costi elevatissimi [83].

8.1 Strategie alternative di efficienza energetica

Per la produzione della carne coltivata l'industria è impegnata ad implementare strategie che rendono il processo più efficiente dal punto di vista energetico e con minori emissioni di carbonio, come l'uso di fonti energetiche rinnovabili, attrezzature ad alta efficienza energetica, ottimizzazione dei processi produttivi, LCA, approccio di economia circolare. Con il superamento di una serie di barriere tecniche ed economiche e le riduzioni dei costi nelle diverse fasi produttive (es. apparecchiature e reattori di perfusione) è possibile abbassare in modo consistente il prezzo di produzione di carne coltivata. Tra le strategie alternative per ridurre il consumo di energia ed abbattere le emissioni di carbonio ci sono il passaggio a fonti di energia rinnovabile

come l'energia solare, eolica o idroelettrica, l'uso di apparecchiature efficienti dal punto di vista energetico (es. illuminazione a LED, elettrodomestici ad alta efficienza), l'ottimizzazione del controllo della temperatura e del consumo di acqua. L'industria, per le emissioni di carbonio rimanenti che non possono essere eliminate, può anche passare alla compensazione delle stesse investendo in progetti specifici come la riforestazione o iniziative di energia rinnovabile, acquistando crediti di carbonio o sostenendo progetti che riducono le emissioni di gas serra. Infine, l'adozione di un approccio di economia circolare, con il riciclo e riutilizzo dei materiali e sottoprodotti, l'ottimizzazione dell'utilizzo dei nutrienti, può aiutare a ridurre gli sprechi e massimizzare l'efficienza delle risorse. Le voci di costo critiche riguardano i bioreattori, terreni di coltura contenenti siero e fattori di crescita. I bioreattori, per via del costo elevato legato all'utilizzo nel settore biofarmaceutico, necessitano di essere ottimizzati per la produzione di carne coltivata. L'azienda Believer Meats ha impiegato con successo un bioreattore a serbatoio agitato all'interno del quale le cellule vengono fatte crescere su microcarrier nel mezzo liquido senza aderire alle superfici e raggiungere una densità cellulare di 10^8 per ml, ciò garantisce una superficie maggiore per unità di volume di terreno rispetto ai contenitori di coltura tissutale. Aumentare la densità cellulare significa ridurre i costi di produzione in quanto si ottiene più carne e si riducono il numero di bioreattori e le dimensioni delle camere sterili [84]. La start-up Orbillion Bio che ha collaborato con Sola Biotech specializzata in bio-processi per la costruzione di bioreattori di capacità fino a 20.000 litri e produzioni di oltre 1.800 tonnellate di carne all'anno, per aumentare la resa, fa crescere le cellule di manzo wagyu sospese nel terreno di coltura [85]. Una soluzione per la riduzione dei costi di produzione proviene dai laboratori della Tufts University Center for Cellular Agriculture (TUCCA), i cui ricercatori hanno modificato le cellule staminali muscolari bovine (manzo) in modo da produrre il proprio fattore di crescita dei fibroblasti (FGF) e innescare la crescita delle cellule muscolari scheletriche [86]. I metodi di produzione alternativi prevedono anche il riciclo dei fattori di crescita utilizzati dalle stesse cellule in coltura (media recycling systems); l'utilizzo di terreni di crescita a base vegetale contenenti isolati proteici di colza [87], proteine di soia, proteine di piselli ed estratti di alghe, che forniscono aminoacidi essenziali, vitamine e minerali necessari per la crescita; adattamento delle linee cellulari in terreni privi di siero, sostituzione di materie prime di grado farmaceutico con quelli di qualità alimentare, fattori di crescita alternativi. Per avere produzioni sostenibili di carne coltivata occorre evitare l'utilizzo di componenti di derivazione animale per la differenziazione delle cellule satellite in fibre muscolari mature. Come alternativa all'impiego dei substrati contenenti sieri fetali, il cui utilizzo per la produzione di carne coltivata su larga scala sarà molto limitato a causa dei prezzi (il siero fetale bovino ad esempio, costa in genere oltre 1.000 dollari al litro), variabilità da lotto a lotto, presenza di endotossine e aspetti etici, vengono proposte nuove tecnologie, come quelle che consentono ai miociti di svilupparsi in assenza di siero animale (serum-free). Si tratta di terreni di proliferazione artificiali Essential8 (E8®) e Beefly-9 contenenti fattori di crescita derivanti da batteri, lieviti o alghe geneticamente modificati, o ottimizzazione di terreni chimicamente definiti utilizzando fattori di crescita espressi in modo ricombinante e altre proteine essenziali [88]. Studi recenti hanno proposto nuove tecnologie che consentono ai miociti di svilupparsi in assenza di siero animale. La start-up ceca Mewery sta studiando una tecnologia per la sostituzione del siero fetale bovino, basata sulla co-coltivazione di alghe e cellule animali nello stesso bioreattore, utilizzando fattori di crescita di microalghe ingegnerizzate per stimolare la crescita delle cellule dei mammiferi [89]. L'azienda americana OMeat propone la possibilità di fare plasmateresi regolare di bovino adulto ed usare alcune componenti del siero nel processo produttivo al posto del siero fetale bovino [90]. Per ovviare all'utilizzo del siero e a causa della sua variabilità nella composizione da lotto a lotto e il rischio di contaminazione, i ricercatori dell'Università di Nottingham, insieme a colleghi delle Università di Cambridge, Exeter, Tokyo e Meiji (Giappone) hanno sviluppato linee di cellule staminali da

embrioni di suini, pecore e bovini che crescono senza bisogno di siero, o antibiotici [91]. Ci sono anche studi che si basano sul sequenziamento dell'RNA per studiare il rimodellamento trascrittomico delle cellule satellite bovine durante la differenziazione miogenica indotta dalla carenza di siero [92] o l'approccio omico per identificare i segnali cellulari chiave (es. miocchine) che promuovono la crescita cellulare e controllano l'attività cellulare durante la produzione di carne in assenza di siero [93]. I fattori di crescita, realizzati a partire da proteine ricombinanti, in particolare FGF-2 e TGF- β costano nell'ordine di 150-200 USD al litro a concentrazioni medie standard, e come già accennato, sono una voce di spesa importante per la produzione della carne coltivata fino a oltre il 90% sui costi poiché non durano a lungo nei terreni di coltura cellulare e devono essere continuamente reintegrati. Sono stati esplorati diversi potenziali mimetici dei questi fattori chiave di crescita che potrebbero essere utili per sostituire o integrare FGF-2 e TGF- β nel terreno di coltura [94]. Togliere questi ingredienti di tipo farmaceutico dai substrati o sostituirli con le versioni alimentari, consentirebbe di ottenere enormi risparmi sui costi.

8. Conclusioni

La maggior parte della comunità scientifica ritiene che rispetto alle carni convenzionali la carne coltivata possa costituire una fonte sostenibile di proteine animali con minore impatto sull'ambiente, minor impronta di carbonio, uso ridotto del suolo e di acqua ed una risposta ai problemi di fabbisogno proteico futuro [95]. Pur riconoscendo questi vantaggi, la carne coltivata è una tecnologia promettente, ma in fase iniziale, che presenta sfide tecniche fondamentali. Sono necessari ulteriori studi e evidenze di sostenibilità ambientale ed efficienza energetica finalizzati ad ottimizzare le relative tecnologie di produzione su scala industriale. Il processo di produzione deve ancora realizzare il passaggio completo verso l'impiego di componenti, terreni di coltura, microcarrier ed impalcature che non derivino dai sottoprodotti della macellazione degli animali o dalle colture utilizzate per la loro alimentazione. Per i costi ambientali i detrattori sostengono che la carne coltivata non è ecologica, mentre le valutazioni LCA pubblicate in letteratura dimostrano complessivamente il contrario. Se le analisi dei costi di capitale e di esercizio degli impianti di produzione industriale di carne coltivata indicano un'economia di produzione che probabilmente ne limita l'accessibilità, per il futuro occorrerà incrementare gli sforzi di ricerca per il miglioramento dell'efficienza energetica, che puntino su fonti rinnovabili, sviluppo di terreni a basso costo strategie basate su riduzioni combinate dei costi con la collaborazione dei soggetti che operano nella catena di approvvigionamento a partire dagli ingredienti dei terreni, fattori di crescita, proteine ricombinanti ed apparecchiature per i reattori di perfusione. La scalabilità economica della carne coltivata richiede il superamento della logica *silos* delle linee di ricerca attraverso la collaborazione degli sviluppatori e la condivisione dei dati di sicurezza e nutrizionali. Ad esempio la start-up cinese CellX per accelerare l'industrializzazione della carne coltivata, collabora strettamente con la società di bioreattori Tofflon per progettare e costruire una piattaforma di bioreattore pilota e un impianto di produzione [96]. Allo stato attuale possiamo sostenere che i costi associati a livelli produttivi industriali di carne coltivata non consentono di soddisfare la domanda crescente di proteine animali. Se solo volessimo soddisfarla per il 2050 in cui si prevede un aumento del 35-56% rispetto al fabbisogno attuale di circa 200 milioni di tonnellate (percentuali che cresceranno per gli effetti del cambiamento climatico), avremmo bisogno di 60 tonnellate di proteine in più, non ottenibili con le attuali tecnologie [97]. Il massimo *scaling-up* ottenibile con le tecnologie attuali comporta la costruzione di reattori con capacità massima di 20 kL in grado di produrre in circa 40 giorni (l'intero ciclo di inizio-proliferazione-raccolta biomassa cellulare) tre tonnellate di

biomassa fresca. Se si escludono i tempi per le sanificazioni, in un anno potrebbero essere svolti un massimo di 10 cicli per bioreattore con una produzione teorica totale di 300 tonnellate di biomassa cellulare [98]. Su scala globale se volessimo sostituire il 10% del mercato globale di carne entro il 2030 per un totale di 40 milioni di tonnellate, sarebbero necessari 4.000 laboratori di carne coltivata con circa 130 bioreattori ciascuno. Con il costo di ciascun laboratorio di 450 milioni di dollari la spesa raggiunge 1,8 trilioni di dollari [99]. Tuttavia, come la storia ha dimostrato, con il miglioramento delle tecnologie, il costo di produzione può diminuire fino a incoraggiare la produzione su larga scala. Riguardo alla sicurezza per il consumatore, sebbene i rischi microbiologici e di presenza di antibiotici, sono praticamente gli stessi della carne convenzionale in quanto la produzione avviene in laboratori dotati di efficaci sistemi di controllo e monitoraggio, sono necessari studi di valutazione del rischio specifici per le diverse tipologie di prodotto. Il processo di produzione dovrà conformarsi a standard di sicurezza uniformi e specifici per le diverse tipologie di prodotti e a linee guida sviluppate attraverso la collaborazione tra industria, gruppi di ricerca, mondo accademico ed autorità regolatorie. In ambito europeo, il compito dell' EFSA è di definire standard di valutazione della sicurezza sulla base degli ultimi sviluppi scientifici anche attraverso la collaborazione con i produttori. Sebbene la carne coltivata abbia già raggiunto alcuni mercati nazionali, pochi sono gli studi sulle proprietà sensoriali (gusto e consistenza) e non ci sono dati pubblici disponibili su sicurezza e contenuto nutrizionale, se si considera inoltre che la maggior parte delle informazioni tecnologiche costituiscono proprietà intellettuale delle aziende che le hanno prodotte e le start-up in fase iniziale, ad eccezione dell'autorizzazione per il mercato, non hanno alcun incentivo a rilasciare i propri dati, per la revisione di terze parti poiché ciò favorirebbe i competitors. A tale scopo sarà fondamentale facilitare la condivisione e l'accesso di banche dati attraverso una partnership pubblico-privata, assicurare una maggiore regolamentazione internazionale ed armonizzazione delle norme per l'industria della carne e sensibilizzare i governi per il supporto economico del settore. Occorrerà anche affrontare gli aspetti nutrizionali della carne coltivata e le proprietà sensoriali tutte informazioni tecnologiche di proprietà delle aziende di produzione. Ma quando potremo vedere la carne in vendita nei supermercati? Mosa Meat, l'azienda più avanzata al momento, prevede che ci vorranno 4 o 5 anni. E' indubbio che la sua penetrabilità nel mercato dipenderà anche dal contesto sociale di riferimento, spesso ridotto alle due questioni chiave dell'etica ed accettazione dei consumatori (100). Diversamente il successo del settore della carne coltivata dipenderà anche dal complesso apparato sociale e dalle politiche governative, compresi la regolamentazione e i regimi fiscali e di sussidio e da come le ambiguità modelleranno il sistema normativo emergente [39]. I consumatori potranno superare le barriere psicologiche del cibo derivato da colture cellulari, solo se i prodotti, come la carne coltivata che si affiancheranno a quelli convenzionali sugli scaffali dei supermercati, avranno lo stesso sapore, saranno sicuri e più sostenibili delle alternative tradizionali. Dal punto di vista della diversità poi, sia in termini di ambiente e biodiversità, sia di scelta è positivo avere una vasta gamma di opzioni che includano prodotti vegani, vegetariani e a base di carne. Infine, nel Programma delle Nazioni Unite per l'ambiente si sottolinea come la prossima pandemia sarà molto probabilmente legata all'allevamento intensivo, mentre l'impiego degli antibiotici in allevamento continuerà ad essere un driver rilevante del fenomeno dell'antibiotico resistenza. La carne coltivata riduce a zero entrambi i rischi: meno animali significa ridotto uso di antibiotici e meno potenziali incubatori di virus o altri agenti infettivi che potrebbero effettuare lo spillover e causare la prossima pandemia.

Riferimenti

1. United Nations Environment Programme. Preventing the Next Pandemic: Zoonotic Diseases and How to Break the Chain of Transmission (UNEP, 2020).
2. Saied AA, Chandran D, Chopra H, Dey A, Emran TB, Dhama K. Cultivated meat could aid in reducing global antimicrobial resistance burden - producing meat without antibiotics as a safer food system for the future. *Int J Surg.* 2023 Feb 1;109(2):189-190. doi: 10.1097/JS9.000000000000199. PMID: 36799847; PMCID: PMC10389608.
3. Steinfeld H, Gerber P, Wassenaar TD, Castel V, Rosales M, Rosales M, et al. *Livestock's long shadow: environmental issues and options.* Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2006.
4. Gerber PJ, Steinfeld H, Henderson B, Mottet A, Opio C, Dijkman J, Falcucci A, Tempio G (2013) *Tackling climate change through livestock: a global assessment of emissions and mitigation opportunities.* Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
5. Will Cultured Meat and Meat Alternatives Disrupt the Agricultural and Food Industry? ATKearney. 2019).
6. FAO-WHO. 2023. Food safety aspects of cell-based food. ISBN: 978-92-4-007094-3. WHO REFERENCE NUMBER: CC4855EN/1/03.23.
7. Holmes, M. (2023). Yeast, coal, and straw: J. B. S. Haldane's vision for the future of science and synthetic food. *History of the Human Sciences*, 0(0).
8. M.S. Arshad, M. Javed, M. Sohaib, F. Saeed, A. Imran, Z. Amjad. Tissue engineering approaches to develop cultured meat from cells: A mini review *Cogent Food And Agriculture*, 3 (2017), pp. 1-11.
9. Van Eelen WF, van Kooten WJ, Westerhof W. World Intellectual Property Organization Patent WO/99/31222. Industrial production of meat from in vitro cell cultures. 1999 Jun 24.
10. M.A. Benjaminson, J.A. Gilchrist, M. Lorenz In vitro edible muscle protein production system (MPPS): Stage 1, fish *Acta Astronautica*, 51 (2002), pp. 879-889.)
11. M. Post Cultured beef: Medical technology to produce food, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94 (2014), pp. 1039-1041).
12. Garrison, G. L., Biermacher, J. T. & Brorsen, B. W. How much will large-scale production of cell-cultured meat cost? *J. Agric. Food Res.* 10, 100358 (2022).
13. <https://gfi.org/wp-content/uploads/2023/01/Cultivated-meat-industry-summary-2023.pdf>.
14. US Food & Drug Administration. Cell Culture Consultation (CCC) 000002, Cultured Gallus gallus Cell arterial (FDA, 2022).
15. Regolamento (UE) 2015/2283 relativo ai nuovi alimenti e che modifica il regolamento (UE) n. 1169/2011 del Parlamento europeo e del Consiglio e abroga il regolamento (CE) n. 258/97 del Parlamento europeo e del Consiglio e il regolamento (CE) n. 1852/2001 della Commissione.
16. <https://www.thecultivatedb.com/the-cultivated-b-initiated-pre-submission-process-towards-efsa-certification-for-cultivated-sausage/>.
17. <https://www.telegraph.co.uk/news/2023/09/29/uk-lab-grown-meat-fast-track-approval-israel-deal/>.
18. <https://gfieurope.org/blog/federal-budget-2024-germany-invests-38-million-euros-in-the-protein-transition-and-sets-out-to-become-a-leader-in-the-field..>
19. <https://www.bloomberg.com/news/features/2023-02-07/lab-grown-meat-has-bigger-challenges-than-the-fda>.
20. <https://www.swissinfo.ch/eng/sci-tech/start-up-files-request-to-sell-lab-grown-steak-in-switzerland/48690776>.
21. <https://www.nutreco.com/en/news/nutreco-and-mosa-meat-receive-grant-taking-cellular-agriculture-a-step-closer-to-commercial-viability/>.
22. <https://gfieurope.org/blog/horizon-europe-announces-e32-million-for-sustainable-proteins/>.
23. <https://www.reuters.com/article/jbs-labmeat/brazils-jbs-starts-building-lab-grown-beef-factory-in-spain-idUSKBN2XS1ON/>.
24. <https://www.reuters.com/article/brf-investment-idUSL2N2OJ15M/>.
25. <https://www.eitfood.eu/news/feasts-has-been-launched-a-research-project-on-cultured-meat-and-seafood-explores-the-future-of-protein>.
26. <https://gfi.org/wp-content/uploads/2022/04/2021-Cultivated-Meat-State-of-the-Industry-Report-1.pdf>.

27. <https://thefishsite.com/articles/dicaprio-and-bezos-join-wildtypes-100-million-series-b-funding-cell-cultured-seafood>.
28. <https://gfi.org/press/gfi-delauero-clark-celebrate-first-ever-national-institute-for-cellular-agriculture/>.
29. <https://www.pr.com/press-release/839696>.
30. The Good Food Institute. 2022 State of the Industry Report: Cultivated Meat and Seafood (GFI, 2022).
31. Lab DF. No In 2040, clean meat will be the size of conventional meat. 2020; Holmes, D., Humbird, D., Dutkiewicz, J. et al. Cultured meat needs a race to mission not a race to market. *Nat Food* 3, 785–787 (2022).
32. A call for an 'Asilomar' for cultivated meat and seafood. Correspondence. *Nature Biotechnology*: <https://doi.org/10.1038/s41587-023-01849-x>.
33. <https://www.timesofisrael.com/in-first-leading-kosher-authority-orthodox-union-certifies-lab-grown-meat>.
34. Catts O, Zurr I. Growing semi-living sculptures: the tissue culture & art project. *Leonardo*. 2002;35:365–370; Ben-Arye T and Levenberg S (2019). *Tissue Engineering for Clean Meat Production*. *Front. Sustain. Food Syst.* 3:46. doi: 10.3389/fsufs.2019.00046.
35. Specht, L. (2019). An Analysis of Culture Medium Costs and Production Volumes for Cell-Based.
36. Vincent Bodiou e coll.. *Microcarriers for Upscaling Cultured Meat Production*. *Sec. Nutrition and Food Science Technology Volume 7 – 2020*.
37. Allan, S. J., Ellis, M. J., & De Bank, P. A. (2021). Decellularized grass as a sustainable scaffold for skeletal muscle tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 109(12), 2471-2482. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.37241>.
38. Hayflick, L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research* 37, 614–636 (1965).
39. Neil Stephens e coll. Bringing cultured meat to market: Technical, socio-political, and regulatory challenges in cellular agriculture. *Trends in Food Science & Technology Volume 78*, August 2018, Pages 155-166.
40. Saad MK, Yuen JSK Jr, Joyce CM, Li X, Lim T, Wolfson TL, Wu J, Laird J, Vissapragada S, Calkins OP, Ali A, Kaplan DL. Continuous fish muscle cell line with capacity for myogenic and adipogenic-like phenotypes. *Sci Rep.* 2023 Mar 29;13(1):5098.
41. <https://en.wikipedia.org/wiki/HeLa>
42. Nicola Jones. Will cultured meat replace the real thing? *Nature | Vol 619 | 6 July 2023*.
43. Arandel, L.; et al. Immortalized human myotonic dystrophy muscle cell lines to assess therapeutic compounds. *Disease Models & Mechanisms* 2017, 10, 487–497.
44. Soice, E.; Johnston, J. Immortalizing Cells for Human Consumption. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, 22, 11660).
45. Pasitka, L., Cohen, M., Ehrlich, A. et al. Spontaneous immortalization of chicken fibroblasts generates stable, high-yield cell lines for serum-free production of cultured meat. *Nat Food* 4, 35–50 (2023).
46. Andrew J. Stout, e col.. Immortalized Bovine Satellite Cells for Cultured Meat Applications. *ACS Synthetic Biology* 2023 12 (5), 1567-1573.
47. FDA Center for Food Safety and Applied Nutrition. FDA Completes First Pre-Market Consultation for Human Food Made Using Animal Cell Culture Technology. 2022.
48. <https://www.bloomberg.com/news/features/2023-02-07/lab-grown-meat-has-bigger-challenges-than-the-fda>.
49. <https://www.efsa.europa.eu/en/news/safety-cell-culture-derived-food-ready-scientific-evaluation>.
50. Ferone, M.; Gowen, A.; Fanning, S.; Scannell, A.G.M. Microbial Detection and Identification Methods: Bench Top Assays to Omics Approaches. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2020, 19, 3106–3129.
51. Ong KJ, Tejada-Saldana Y, Duffy B, Holmes D, Kuk K, Shatkin JA. Cultured Meat Safety Research Priorities: Regulatory and Governmental Perspectives. *Foods*. 2023 Jul 8;12(14):2645. doi: 10.3390/foods12142645. PMID: 37509737; PMCID: PMC10379195.
52. Ong, K.J.; Johnston, J.; Datar, I.; Sewalt, V.; Holmes, D.; Shatkin, J.A. Food Safety Considerations and Research Priorities for the Cultured Meat and Seafood Industry. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2021, 20, 5421–5448.

53. B.J. Wood, J.A. Archer, J.H.J. van der Werf. Response to selection in beef cattle using IGF-1 as a selection criterion for residual feed intake under different Australian breeding objectives. *Livestock Production Science* Volume 91, Issues 1–2, 1 December 2004, Pages 69–81.
54. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives; Food and Agriculture Organization of the United Nations; World Health Organization (Eds.) *Residue Evaluation of Certain Veterinary Drugs*; FAO JECFA monographs; Food and Agriculture Organization of the United Nations: Geneva, Switzerland, 2014; ISBN 978-92-5-108300-0.
55. Ding, S.; Swennen, G.N.M.; Messmer, T.; Gagliardi, M.; Molin, D.G.M.; Li, C.; Zhou, G.; Post, M.J. Maintaining Bovine Satellite Cells Stemness through P38 Pathway. *Sci. Rep.* 2018, 8, 10808.
56. Ng, S.; Kurisawa, M. Integrating Biomaterials and Food Biopolymers for Cultured Meat Production. *Acta Biomater.* 2021, 124, 108–129.
57. Department of Health and Human Services. *Report on Carcinogens, Fifteenth Edition: Phenolphthalein*; Department of Health and Human Services: Research Triangle Park, NC, USA, 2021; pp. 1–3.
58. Derrick Risner, e coll.. (2023). Environmental impacts of cultured meat: A cradle-to-gate life cycle assessment.
59. Fishel S, Jackson P, Webster J, Faratian B. Endotoxins in culture medium for human in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 1988 Jan;49(1):108–11. doi: 10.1016/s0015-0282(16)59659-9. PMID: 3335256.
60. Food Standard Agency (2023). Identification of hazards in meat products manufactured from cultured animal cells: Hazards
61. Nawaz MA, Mesnage R, Tsatsakis AM, Golokhvast KS, Yang SH, Antoniou MN, Chung G. Addressing concerns over the fate of DNA derived from genetically modified food in the human body: A review. *Food Chem Toxicol.* 2019 Feb;124:423–430.
62. Andrew J. Stout, e col.. Immortalized Bovine Satellite Cells for Cultured Meat Applications. *ACS Synthetic Biology* 2023 12 (5), 1567–1573.
63. Pavan Kumar Neelesh Sharma, Shubham Sharma et al.. In-vitro meat: a promising solution for sustainability of meat sector. Review. *J Anim Sci Technol* 2021;63(4):693–724
64. Ilse Fraeye, Marie Kratka, Herman Vandeburgh, and Lieven Thorrez. Sensorial and Nutritional Aspects of Cultured Meat in Comparison to Traditional Meat: Much to Be Inferred. *Front Nutr.* 2020; 7: 35.
65. Stout, A.J.; Mirliani, A.B.; Soule-Albridge, E.L.; Cohen, J.M.; Kaplan, D.L. Engineering Carotenoid Production in Mammalian Cells for Nutritionally Enhanced Cell-Cultured Foods. *Metab. Eng.* 2020, 62, 126–137.
66. Poore, J., & Nemecek, T. (2018). Reducing food's environmental impacts through producers and consumers. *Science*, 360.
67. Gerber PJ, Steinfeld H, Henderson B, Mottet A, Opio C, Dijkman J, Falcucci A, Tempio G (2013) Tackling climate change through livestock: a global assessment of emissions and mitigation opportunities. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
68. Xu, X., Sharma, P., Shu, S. et al. Global greenhouse gas emissions from animal-based foods are twice those of plant-based foods. *Nat Food* 2, 724–732 (2021). <https://doi.org/10.1038/s43016-021-00358-x>.
69. Tuomisto HL, Teixeira de Mattos MJ (2011) Environmental impacts of cultured meat production. *Environ Sci Technol* 45:6117–6123.
70. Tuomisto HL, Allan SJ, Ellis MJ (2022) Prospective life cycle assessment of a bioprocess design for cultured meat production in hollow fiber bioreactors. *Sci Total Environ* 851:158051.
71. Robert Vergeer, Pelle Sinke, Ingrid Odegard. (2021). Report. TEA of cultivated meat. Future projections for different scenarios.
72. <https://www.scribd.com/document/526220188/Cultivated-Meat-review-of-the-cost-of-manufacturing>.
73. Rodríguez Escobar, M.I.; Cadena, E.; Nhu, T.T.; Cooreman-Algoed, M.; De Smet, S.; Dewulf, J. Analysis of the Cultured Meat Production System in Function of Its Environmental Footprint: Current Status, Gaps and Recommendations. *Foods* 2021, 10, 2941.
74. Sinke, P., Swartz, E., Sanctorem, H., van der Giesen, C. & Odegard, I. Ex-ante life cycle assessment of commercial-scale cultivated meat production in 2030. *Int. J. Life Cycle Assess* 28, 234–254 (2023).
75. Collett, K., O'Callaghan, B. Mason, M., Godfray, C. & Hepburn, C. *The Climate Impact of Alternative Proteins* (Oxford Smith School of Enterprise and the Environment, 2021).

76. Lynch J and Pierrehumbert R (2019). Climate Impacts of Cultured Meat and Beef Cattle. *Front. Sustain. Food Syst.* 3:5.
77. Derrick Risner, e coll.. (2023). Environmental impacts of cultured meat: A cradle-to-gate life cycle assessment.
78. [Sergiy Smetana e coll. Meat Alternatives: Life Cycle Assessment of Most Known Meat Substitutes. July 2015. *The International Journal of Life Cycle Assessment* 20(9).
79. Sophie Hubalek, Mark J. Post, Panagiota Moutsatsou, Towards resource-efficient and cost-efficient cultured meat, *Current Opinion in Food Science*, Volume 47, 2022, 100885, ISSN 2214-7993: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2022.100885>.Hubalek et al., 2022.
80. Amin Nikkhah et al. Toward sustainable culture media: Using artificial intelligence to optimize reduced-serum formulations for cultivated meat. *Science of The Total Environment* Volume 894, 10 October 2023, 164988.
81. Neil_Dullaghan, Linch O. Forecasts estimate limited cultured meat production through 2050. *Effective Altruism Forum* Mar 22 2022.
82. GFI. Anticipated growth factor costs and volumes: <https://gfi.org/resource/cultivated-meat-growth-factor-volume-and-cost-analysis/>.
83. Elliot Swartz, Good Food Institute (GFI) (2023). Anticipated growth factor and recombinant protein costs and volumes necessary for cost-competitive cultivated meat.
84. Hubalek, S., Post, M. J. & Moutsatsou, P. Towards resource-efficient and cost-efficient cultured meat. *Curr. Opin.Food Sci.* 47, 100885 (2022).
85. <https://www.foodnavigator-usa.com/Article/2022/12/07/orbillion-bio-teams-up-with-solar-biotech-to-scale-up-cultivated-meat-platform-in-the-us>.
86. <https://now.tufts.edu/2024/01/26/cultivated-meat-production-costs-could-fall-significantly-new-cells-created-tufts>.
87. Andrew J. Stout, Miriam L. Rittenberg, Michelle Shub, Michael K. Saad, Addison B. Mirliani, James Dolgin, David L. Kaplan, A Beefy-R culture medium: Replacing albumin with rapeseed protein isolates, *Biomaterials*, Volume 296, 2023.
88. Stig Skrivergaard et coll. A simple and robust serum-free media for the proliferation of muscle cells. *Food Research International* Volume 172, October 2023, 113194.
89. <https://www.planetfood.news/post/czech-startup-mewery-creates-cultivated-pork-meat-prototype-using-micro-algae>.
90. <https://www.fooddive.com/news/omeat-cultivated-beef-cow-plasma-price-parity/653697/>.
91. <https://www.nottingham.ac.uk/news/stem-cell-study-paves-way-for-manufacturing-cultured-meat>.
92. Messmer, T., Klevernic, I., Furquim, C. et al. A serum-free media formulation for cultured meat production supports bovine satellite cell differentiation in the absence of serum starvation. *Nat Food* 3, 74–85 (2022).
93. Shaikh, S.; Lee, E.; Ahmad, K.; Ahmad, S.-S.; Chun, H.; Lim, J.; Lee, Y.; Choi, I. Cell Types Used for Cultured Meat Production and the Importance of Myokines. *Foods* 2021, 10, 2318.
94. Jacob Reiss et coll. Cell Sources for Cultivated Meat: Applications and Considerations throughout the Production Workflow. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22(14), 7513.
95. Kumar P, Sharma N, Sharma S, Mehta N, Verma AK, Chemmalar S, Sazili AQ. In-vitro meat: a promising solution for sustainability of meat sector. *J Anim Sci Technol.* 2021 Jul;63(4):693-724.
96. Ning Xiang & Ximing Zhang. 2023. The challenges of bringing cultured meat to the market. *Nature reviews bioengineering*.
97. van Dijk, M., Morley, T., Rau, M.L. et al. A meta-analysis of projected global food demand and population at risk of hunger for the period 2010–2050. *Nat Food* 2, 494–501 (2021).
98. <https://edepot.wur.nl/563404>.
99. Food Navigator. Cell-based disruption: how many factories, and at what capacity, are required to supply 10% of the meat market? By Flora Southey. 23 November 2021.
100. Ashkan Pakseresht, Sina Ahmadi Kaliji, Maurizio Canavari, Review of factors affecting consumer acceptance of cultured meat, *Appetite*, Volume 170, 2022, 105829, ISSN 0195-6663.