

生物培育肉三维培养支架材料研究进展

胡海娟, 李莹莹, 杨峰, 王守伟*
(中国肉类食品综合研究中心 北京 100068)

摘要 生物培育肉因可通过动物细胞体外培养方式生产肉类, 解决当前养殖业转化效率低、资源耗费大且污染环境等问题, 故被认为是替代蛋白最有前景的技术之一。然而, 在体外构建具有真实质感的肌肉组织, 需开发合适的细胞三维培养支架材料和三维培养体系, 进而实现细胞的三维培养与生长, 这限制了生物培育肉的发展和应用。本文综述当前生物培育肉三维培养支架材料和培养体系构建方法的研究现状, 对现有材料的可食用性进行分析, 以期为未来生物培育肉的研究与应用提供参考。

关键词 生物培育肉; 三维培养; 支架材料; 构建方法

文章编号 1009-7848(2023)09-0388-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.09.041

近年来, 随着经济的快速发展、人口的持续增长和收入的不断增加, 全球对肉品的需求在快速增长。联合国粮食及农业组织(FAO)对 2050 年的预测显示, 随着肉类需求持续增长, 全球仅肉类(不包括鸡蛋和海鲜)需求在 2050 年将达到 4.55 亿 t, 与 2005 年全球肉类总产量相比, 增长了 76%^[1]。长期以来, 养殖、屠宰动物是传统肉类生产供应的唯一途径, 然而, 这种肉类获取方式存在转化周期长、转化效率低、资源耗费大且污染环境等问题。FAO 报告显示, 全球约 30% 的农作物被用于畜牧业饲养动物, 由于饲料物质转化率低, 因此整个生态链的物质转化效率极低^[2]。肉鸡养殖业中每生产 1 kg 蛋白质, 需要饲喂肉鸡 27~28 kg 干物质饲料, 转化效率不足 4%^[3]。为了满足人类对肉类食品日益扩大的消费需求, 传统肉制品的生产供应方式只能通过大规模饲养动物实现。全球的养殖业占用了地球 30% 可耕地面积, 消耗了全球 8% 的淡水资源, 产生了全球 18% 的温室气体^[2]。如果完全依赖大力发展养殖业来满足肉制品消费, 会造成巨大的资源浪费和环境污染。2022 年 3 月 6 日, 习近平主席参加全国政协十三届五次会议的农业界、社会福利和社会保障界委员的联组会指

出, 要树立大食物观, 发展生物科技、生物产业, 向植物、动物、微生物要热量、要蛋白。大食物观的提出推动了肉类替代产品的多途径研发, 一场追求高效、环保、可持续的替代蛋白肉类科技变革正在全球悄然兴起, 开发新型肉类产品替代传统肉类成为一个亟待解决的问题, 生物培育肉应运而生。

生物培育肉又被称作培育肉、细胞培养肉、清洁肉等, 是利用动物细胞体外培养的方式控制其快速增殖、定向分化并收集加工而成的一种新型肉类食品^[4]。2019 年, 该项技术被《麻省理工科技评论》入选为人类的“十大突破性技术”之一, 被认为是最有可能解决未来人类肉品生产和消费困境的解决方案之一, 具有极高的潜在商业价值^[5]。根据生命周期评估分析结果, 相较于传统牛肉、羊肉和猪肉生产方式, “生物培育肉”生产单位质量肉类可以减少 7%~45% 的能源消耗, 降低 78%~96% 的温室气体排放量, 降低 99% 以上的土地使用, 减少 82%~96% 的用水量等^[5], 而且生产效率远高于传统畜牧业。因此, 发展生物培育肉是保障未来肉品供应多样化选择的重要战略举措, 是未来食品领域发展的必然趋势。

生物培育肉的目标是通过体外培养细胞, 制造 1 块与真正肌肉组织的营养、外观、质构和味道高度相似的肉。传统的细胞二维培养方法由于无法真正模拟体内的微环境, 因此, 二维环境中生长的细胞形态不同于体内生长的细胞, 并会造成二者在包括增殖、分化、蛋白质和基因表达在内的细

收稿日期: 2022-09-04

基金项目: 北京市博士后工作经费资助项目(2022-ZZ-113); 国家重点研发计划项目(2021YFC2101400)

第一作者: 胡海娟, 女, 博士, 工程师

通信作者: 王守伟 E-mail: cmrcsw@126.com

胞过程的差异^[6]。细胞经二维培养后只能获得几乎看不见的平面薄层细胞^[7],无法满足细胞生长发育为块状肉的要求。与传统的二维培养不同,细胞的三维培养能够最大程度地模拟细胞在体内的情况,重现细胞的体内环境,可以形成氧气、营养物质、代谢物和可溶信号的梯度,使细胞呈现出空间立体生长的状态^[8]。若要在体外构建具有真实质感的肌肉组织,需依靠细胞三维培养支架材料和三维培养体系实现细胞的三维培养,从而实现肌肉组织的体外塑形和构建。目前,有研究对生物培育肉三维培养体系构建方法进行综述^[9],而生物培育肉所需三维培养支架材料的性能尚未引起广泛关注。此外,用于生物培育肉制造的材料应符合食品安全监管标准,具备可食性^[10]。目前尚未见有关生物培育肉三维培养支架材料可食用性的报道。本文以生物培育肉的生产制造为背景,总结生物培育肉三维培养支架材料性能及三维体系构建方法的优缺点,并对支架材料的可食用性进行分析,以期期为生物培育肉发展提供理论参考。

1 生物培育肉三维培养支架材料

1.1 天然三维培养支架材料

在天然肌肉组织中,细胞外基质是动物组织的一部分,主要由结构蛋白质(如胶原蛋白、弹性蛋白)、特殊蛋白质(如纤维蛋白)和蛋白多糖组成^[11]。一般来说,理想的培育肉三维培养支架材料应与自然的细胞外基质结构和功能相似,而且需根据不同类型的细胞作出调整,以便更好地促进细胞在其上黏附、生长并发挥功能。此外,生物培育肉作为一种新型可食替代肉品,其所需理想支架材料除具有上述良好的生物相容性、三维立体多孔结构和一定的机械强度以外,还需具备可食性或者在培养过程中能够完全生物降解。

1) 动物源三维培养支架材料 目前,常见的三维培养动物源支架材料主要由蛋白类、多糖类和明胶等生物大分子、自主装多肽、脱细胞的细胞外基质(dECM)以及三维细胞聚集体组成。

纤维蛋白是通过纤维蛋白原和凝血酶的交联形成的一种天然存在的凝血蛋白,因生物相容性好、可降解^[12],故常用作肌肉组织工程的水凝胶^[13-14]。然而,纤维蛋白的机械性能差^[15],需与其它

生物墨水材料联合使用。纤维蛋白与氧化海藻酸钠通过化学键合形成的天然凝胶结构,可显著促进培养过程中人原代成纤维细胞的存活率与增殖速率^[16]。纤维蛋白由纤维蛋白原水解形成,虽然有研究表明,猪血制备的纤维蛋白原可作为黏结剂应用于重组牛肉加工^[17],但目前我国还未有相关食品法律法规允许将纤维蛋白添加到食品中,其在培育肉的应用需进一步评估。

胶原蛋白是细胞外基质的主要成分,其中,I型和III型胶原蛋白在肌肉细胞中最丰富,其生物相容性好,常被用作3D打印生物墨水材料^[18]。胶原蛋白生物墨水通过调节温度或者pH值产生交联^[19],与未交联的胶原蛋白相比,交联后胶原蛋白的拉伸强度和黏弹性更高^[20-21]。由于胶原蛋白交联需在37℃至少处理30min,当胶原蛋白被直接用于3D打印时,其凝胶状偏硬,因此需与其它凝胶材料复配。胶原蛋白-纤维蛋白混合物可用作肌肉再生的水凝胶,被证明可促进细胞增殖和肌管分化^[22]。Kim等^[23]以胶原蛋白溶液为生物打印墨水,海藻酸盐溶液作印刷浴中的支撑溶液,成功制备了载有细胞的胶原蛋白细丝,该墨水不仅维持C2C12成肌细胞的活力,在培养过程中促进C2C12成肌细胞生长发育,而且最终形成排列整齐的肌管。以牛跟腱胶原蛋白为原料,经与壳聚糖复配可制备可食用微载体支架材料,该材料能够支持小鼠骨骼C2C12成肌细胞、兔平滑肌细胞、绵羊成纤维细胞和牛脐带间充质干细胞的贴附和快速增殖,且在9d的培养期内就能实现接种细胞在载体表面的完全覆盖生长,上述研究结果显示胶原蛋白作为未来开发培养肉制品三维培养支架材料的巨大前景^[24]。根据我国卫食新告字^[25]第0003号规定,胶原蛋白天然存在于鱼皮、鱼鳞中,是天然的食物成分。以鱼皮、鱼鳞为原料,经菠萝蛋白酶和枯草芽孢杆菌酶解制成的胶原蛋白类物质,在我国有一定的食用历史,可作为普通食品生产经营,说明胶原蛋白具备作为可食生物墨水材料应用于生物培育肉生产研究的资质。

透明质酸是交替组成的带负电荷的线性多糖,普遍存在于肌肉细胞外基质,具有良好的黏弹性和高保水性,易于被细胞重塑和降解,在细胞迁移和成肌细胞的成熟期至关重要^[26-27]。透明质酸水

凝胶可显著维持人骨髓间充质基质细胞的活力,培养 21d 后细胞活力保持在 64.4%,并促进其成骨分化^[28]。透明质酸的机械完整性较差,其形成的水凝胶被归类为与某些人体软组织结构相似的软凝胶^[29]。它们的亲水性聚合物网络具有促进葡萄糖和其它营养物质扩散,支持细胞生长的优点,因此,通过和其它物质复合,改变水凝胶中透明质酸的浓度,是调整其凝胶机械性能常用的方法之一。为了提高透明质酸生物墨水的机械性能,接近细胞体内生长环境,有研究通过将热敏细胞外基质和甲基丙烯酸化透明质酸结合,通过光引发剂诱导交联,开发一种具有合适的机械支撑和可见光可打印特性的生物相容性生物墨水,该研究结果表明,添加 10 mg/mL 细胞外基质可显著改善该复合生物墨水的机械性能,MC3T3-E1 细胞在该生物墨水中培养 7 d 后,仍可维持较高细胞活力 $[(94.27 \pm 3.00)\%]$ ^[30]。我国于 2008 年批准透明质酸钠为新资源食品,使用范围为保健食品原料。目前透明质酸钠及其为主要成分的产品在日本、韩国、美国、欧盟、澳大利亚、新西兰和巴西被允许添加在食品或膳食补充剂中。根据《食品安全法》和《新食品原料安全性审查管理办法》,国家卫生健康委员会委托审评机构依照法定程序,组织专家对透明质酸钠的安全性评估材料进行审查且已通过,其有望在培育肉支架领域得到广泛应用。

海藻酸盐是一种廉价的海藻基多糖,具有较好的生物相容性,有利于包载细胞;海藻酸盐生物聚合物可以通过形成毛细管捕获水和其它分子,允许其从内向外扩散,是生物打印领域构建生物墨水最为常用的材料之一^[31-32]。海藻酸盐是由两种单体组成的线性聚阴离子型多糖,其中一种与 Ca^{2+} 相互作用快速交联形成水凝胶^[33]。海藻酸盐与钙离子快速结合是海藻酸盐的优点,其存在不足之处是,钙离子在生理环境下容易与其它单价离子发生置换,从而破坏支架的交联结构,最终导致支架坍塌,这限制了海藻酸盐在生物打印中的应用。有研究^[34]利用聚赖氨酸氨基和海藻酸盐羧基的电荷相互作用进行温和交联,实现支架表面电荷可控性,进而提高海藻酸盐的稳定性;海藻酸盐/聚赖氨酸生物墨水支架在水溶液中具有很好的稳定性,包载细胞的存活率较高,体外细胞试验

证实固定的生长因子或细胞外基质对于干细胞基因表达的调控作用。此外,由于海藻酸钠的化学结构不利于细胞黏附,因此导致细胞黏附力相对较弱,生物相容性差,影响打印后细胞发育成组织,需与明胶、甲基丙烯酸酐化明胶、胶原蛋白、纤维蛋白原等其它天然聚合物相结合,才可为细胞附着提供位点^[35-38]。甲基丙烯酰明胶-海藻酸盐 3D 生物打印墨水中的成肌细胞在生物打印后的第 28 天仍表现出很高的活力 ($>85\%$),并检测到肌球蛋白和肌节肌动蛋白的表达^[39]。为了真实模拟牛肉中的组织,海藻酸盐水凝胶被用作牛脂肪生成的支架,将前脂肪细胞接种在海藻酸盐水凝胶支架中,可显著促进脂肪细胞分化和脂沉积^[40]。海藻酸盐虽不能被细胞重塑或降解,但可以通过改变其结构来控制降解动力学^[33]。根据我国《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》规定,海藻酸钠作为一种增稠剂,在食品生产中可按生产需要适量使用。

琼脂糖是一种从海藻中提取的海洋多糖,因优良的凝胶特性,故是生物医学领域中用途广泛的聚合物生物墨水之一,具有多种应用^[41]。虽然琼脂糖的凝胶特性、机械性能和生物相容性较好,但其促进细胞生长的能力有限^[42],通常需要对其改性。有研究^[43]表明,与天然琼脂糖水凝胶生物墨水 (62%) 相比,使用羧基化琼脂糖热凝胶作为生物墨水打印的人类间充质干细胞的存活率 (95%) 被显著提高。目前,根据我国《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》规定,由琼脂糖和琼脂果胶共同组成的琼脂被允许用于食品加工,而琼脂糖能否直接用于培育肉生产加工,还需进行食品安全性评估。

除上述常见的三维培养动物源支架材料外,随着研究的深入,越来越多的材料也为生物培育肉支架材料提供了更多的选择。自组装肽是不同肽通过非共价相互作用自主形成结构明确且稳定的多肽分子,其可以形成具有纳米纤维结构的水凝胶,提供类似体内细胞外基质的生物物理环境,诱导细胞生长,是一种新型生物墨水^[44-45]。由超短自组装肽水凝胶构成的 3D 打印支架高度模拟了细胞外基质结构,可促进肌管形成,从而诱导 C2C12 成肌细胞在三维培养中的成肌分化,这证

实了自组装肽作为 3D 生物打印墨水的生物相容性^[46],具有作为培育肉生物墨水的潜力。

明胶基三维培养支架是很重要的一类细胞三维培养支架材料。明胶是胶原蛋白的部分水解产物,明胶基结构的生物墨水固有的生物活性特征(包括整合素结合的精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸序列和基质金属蛋白酶消化位点)提供细胞结合位点和生物降解性,被广泛用于肌肉结构的生物打印^[47]。明胶具有低抗原性和易于加工的优势。有研究^[48]表明,将可食用的三维多孔明胶微载体作为细胞扩增支架,能够促进猪骨骼肌卫星细胞、小鼠成肌细胞和小鼠脂肪细胞的高效生长,利用 3D 打印模具,将该猪肉肌肉微组织组装成厘米级肉丸,其机械性能和蛋白质含量皆优于天然猪肉丸。为了增强明胶的可印刷性和支架的机械稳定性,通过将明胶甲基丙烯酸化,使这种材料成为可光交联的甲基丙烯酸酯化明胶(GelMA)。GelMA 的可打印性受浓度影响较大^[49]。为了将其保持在合适的凝胶状态用于骨骼肌 3D 打印,可通过与其它不同类型的光交联材料混合,以增强其可打印性^[50]。甲基丙烯酸海藻酸盐和甲基丙烯酸羧甲基纤维素以及合成聚乙二醇二丙烯酸酯分别与 GelMA 混合后,增强 GelMA 可印刷性的同时,维持了 C2C12 成肌细胞的活性并促进了其分化和排列^[50]。根据我国《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》规定,明胶作为一种添加剂,在食品生产中可按生产需要适量使用,然而目前未见有关 GelMA 的食品许可法规。此外,光引发剂不可食用,这些限制了 GelMA 在培育肉中的应用。明胶通过静电纺丝技术处理后可成为明胶纤维,是一种食品安全成分^[51]。其具有支持细胞黏附、氧气和营养物质输送以及产生排列整齐的纤维促进肌肉纤维成熟等特性,可作为培育肉生产的支架材料。例如:利用旋转喷射纺丝的工艺制得猪源明胶制成的纳米纤维支架材料,可以较好地模仿天然肌肉组织内作结构支架的细胞外基质,其中长度较短的明胶纤维可促进细胞聚集,而长纤维则促进排列整齐肌肉组织的形成,培育的肌肉虽然缺乏天然肌肉中观察到的成熟收缩结构,但拥有真实肉品的一些结构和力学特征^[52]。

由于动物源明胶价格较高,因此应用于生物

培育肉的支架常将其与其它材料复合以降低培育肉生产成本。有研究^[53]表明,通过快速冷冻猪皮源明胶和微生物源透明质酸溶液可制得大孔弹性冻凝胶支架,形成的冰晶作为支架中的交联结构,该支架孔径为 200 μm ,孔隙率大于 90%且具有优良的孔贯通性(交联度大于 99%),体外和体内试验结果均表明,其能够促进猪脂肪干细胞的附着、增殖和成脂分化。这些研究表明明胶作为可食用微载体在培育肉研发领域有巨大潜力。

与上述从水凝胶构建三维组织结构不同,最近把 dECM 作为一种生化成分和改进的三维细胞打印工艺,产生原位排列结构^[54]。来自动物(如猪)组织的 dECM 经历脱细胞和溶解过程后,用于制备 dECM 生物墨水。脱细胞过程后,细胞和 DNA 等大部分免疫原性成分被去除,细胞外基质成分如胶原蛋白、糖胺聚糖、透明质酸和弹性蛋白在很大程度上被保留下来,是组织微环境支持细胞生长、黏附、增殖、迁移和分化的主要组成部分^[55]。因此,dECM 成为 3D 生物打印皮肤组织所需生物墨水的良好来源,dECM 生物墨水适用于挤压和喷墨生物打印。有文献报道,源自去细胞化的猪骨骼肌 dECM,经甲基丙烯酸酯工艺进行化学修饰后可增强其机械稳定性。这种无水凝胶支架接种 C2C12 成肌细胞后,该细胞排列整齐并分化形成肌管^[54]。另一种组织特异型 dECM 生物墨水可有效诱导细胞分化并促进组织形成,与传统胶原蛋白生物墨水相比,这种新的生物墨水可显著促进细胞增殖、生肌基因表达以及高度成熟肌管的形成^[56]。

三维细胞聚集体是一种新型生物墨水,既可与支架材料混合制备生物墨水^[57],也可作为无支架生物墨水直接打印^[58]。有研究^[59]报道,成肌细胞球体可以重组并形成排列整齐的多核肌管。目前还未见有关生物打印骨骼肌细胞聚集体的研究报告。考虑到细胞聚集体对肌管形成的影响,且该打印方式可不使用支架材料,其在生物培育肉相关研究中具有广阔的应用前景。

2) 植物源三维培养支架材料 由于植物组织具有天然的脉管系统和多孔结构,脱细胞后可以促进氧气和养分的运输。随着研究的不断深入,一些脱细胞的天然植物组织被用于生物培育肉支

架材料的研发。成肌细胞分化为肌管是肌肉发育的一个基本过程,包括迁移、黏附、伸长、细胞识别、排列和成肌细胞膜融合,从而形成肌管。菠菜因广泛的可利用性、密集的维管结构和宽叶柄而被作为潜力支架材料^[60-62]。菠菜叶被报道可作为生物培育肉支架材料,并且能在14 d的培养期内保证牛卫星细胞的存活,一些细胞的分化,以及一些样品中的强定向排列^[61]。除菠菜叶外,脱细胞的芹菜和洋葱也具有作为培育肉支架材料的潜力。体外试验表明,脱细胞芹菜支架有利于鼠C2C12成肌细胞贴附,并引导其在维管束方向上排列^[63]。此外,木质部和韧皮部通道直径为10~100 μm ,这是通过接触引导成肌细胞排列的最佳直径,C2C12成肌细胞在增殖培养基生长10 d后,可以观察到F-肌动蛋白丝平行于维管束的纵轴排列,在分化培养基中培养5 d后,成肌细胞保持了排列形态并促进了肌管的形成,引导肌肉细胞排列^[63]。这些结果突出了这种植物衍生支架在体外肌生成研究中的应用潜力,其中结构各向异性需要更接近于体内条件。脱细胞青葱纤维素骨架,尤其是外部白色鳞茎部分,为体外培养骨骼肌提供了一种简单且低成本的支架。脱细胞青葱纤维素支架表面形貌由20 μm 宽、10 μm 深的凹槽重复组成,该形貌具有促进C2C12和人体骨骼肌细胞高度融合和排列的效果,且青葱外部的白色鳞茎部分具有诱导C2C12细胞分化成肌管的微结构^[64]。脱细胞草保留了天然的条纹形貌,在无需额外功能化处理的情况下支持鼠C2C12成肌细胞的黏附、增殖、排列和分化,是一种培育骨骼肌的天然支架^[65]。通过脱细胞技术去除苹果片中原有细胞后,留下的纤维素骨架可作为细胞大规模培养中用到的天然支架,在2周的培养周期内,脱细胞苹果纤维素支架的生物相容性高,可显著促进C2C12成肌细胞的存活与贴附^[66]。

组织化大豆蛋白源自大豆油加工过程的副产物,是一种可食用的多孔植物蛋白质基生物材料。由于其质地和高蛋白含量(50%)特性,常被用于肉品替代物的原材料,可提升终产品的营养价值^[67]。组织化大豆蛋白的多孔性结构有利于细胞贴附,还可根据生物培育肉大规模生产需求,定制为不同的尺寸和形状,因此,组织化大豆蛋白是一

个很有前景的3D支架材料^[68]。以色列海法理工学院Ben-Arye等^[69]以组织化大豆蛋白为原料,开发了一种制备生物培育肉的支架材料,研究表明,该支架可显著支持细胞附着和增殖,并被成功用于3D工程化牛肌肉组织的构建。此外,该研究通过比较几种不同细胞组合的肌生成和细胞外基质沉积情况,发现牛卫星细胞与牛平滑肌细胞共培养及牛卫星细胞、牛平滑肌细胞和牛内皮细胞共培养组合均能促进肌生成和细胞外基质沉积,且与牛卫星细胞单独培养相比,共培养中提高了细胞外基质相关基因的蛋白表达。

目前,为了降低培育肉生产成本,也有研究从大型绿藻中提取海藻纤维素作为哺乳动物细胞生长的支架,体外试验表明,40 d的培养期内,成纤维细胞可维持较高的存活率,且此类支架可显著影响细胞的细胞行为和增殖速率^[70]。然而,生物培育肉培养条件下,纤维素支架的降解性是一个待评估的问题。从营养学角度看,纤维素支架虽不被人体降解,但可以被肠道微生物吸收利用,是一种优势,然而生物培育肉要求支架材料可降解,这是一种劣势。此外,不同来源和方法制得的纤维素降解程度不同,脱细胞苹果纤维素支架的降解速度比细菌纤维素制得的支架更快,这表明一些纤维素基支架可能比其它支架更容易降解^[71-72]。在选择支架时应尽可能选择能够在培养期间被大部分或完全降解的纤维素基支架。

1.2 合成三维培养支架材料

为了开发用于生物培育肉的支架,材料必须是可食用的或可降解的,且不含有毒副产物。组织过程学中最常用的合成聚合物支架材料包括聚乳酸、聚乙醇酸和聚乳酸乙醇酸共聚物^[73]。其中,乳制品副产品中的聚乳酸最近被开发为可食用薄膜^[74]。如果上述材料没有毒副产物产生,生产对环境不会造成很大的影响,且如果吸收速度足够慢,保证细胞在成熟之前都可以存活,那么这些材料也是生物培育肉潜在的支架材料。合成聚合物是非生物活性的,并且通常比天然聚合物的生物相容性差^[75],可以考虑和其它天然合成支架混合使用。

微载体是细胞大规模培养中被常用到的一类支架。Modern Meadow公司申请了一项将果胶和

含精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)的多肽交联制备微载体用作培育肉支架材料的专利^[76]。目前 RGD 肽在食品中的应用尚待批准^[77]。

2 生物培育肉三维培养体系构建方法

2.1 3D 生物打印

3D 生物打印技术是增材制造技术与生物制造技术的有机结合,直接为生物医疗领域服务的 3D 打印可视为 3D 生物打印的范畴^[10]。狭义上,3D 生物打印通常指利用含活细胞的生物墨水打印出活性结构的过程,利用计算机在明确的空间位置上,可同时精确定点地打印各种种子细胞、生物活性因子等物质^[11-12]。该技术发展现状表明,由于 3D 生物打印能制造具有所需形状和生理功能的组织模拟结构,有助于实现活细胞的 3D 成形以及组装成块状的肌肉组织^[13],因此为培育肉生产提供了新途径,在生物培育肉产业具有良好的应用前景^[14]。为了在体外最大程度地模拟细胞在体内的生长环境,选择合适的 3D 生物打印方法可以确保通过一种方便且有效的方式模拟构建生物培育肉组织结构^[65]。

3D 生物打印的主要打印方法可分为挤出式、喷墨式、激光直写式和光固化式打印^[8]。挤出式生物 3D 打印是应用最为广泛的生物打印方法,可以打印黏度较高的生物材料。常选用水凝胶作为包裹细胞的生物材料,然而水凝胶在经济挤出打印成型后,需要一种固定方法来保证所打印结构的稳定性^[78]。喷墨打印是最早的 3D 生物打印技术,是成本相对较低的生物打印技术,打印速度快。然而,该技术受喷头驱动压力和喷墨过程对细胞产生损伤的限制,对生物材料的黏度要求较高^[79],未能在生物培育肉研究中得到广泛应用。激光直写式生物 3D 打印方法可以避免生物墨水和处理装置的直接接触,既不会对细胞造成机械剪切损伤,又可以打印较高黏度的生物材料,而且适用的材料范围也比喷墨打印广泛。该技术目前存在成本高,耗时,重复性不佳等缺点^[80]。光固化式生物 3D 打印和激光直写式打印类似,也是利用光来选择性交联生物墨水,层层固化形成三维结构。虽然光固化式生物 3D 打印的效率和精度都比较高且装

置简单易控制,但其缺点是紫外光及其引发剂会对细胞造成损伤,且光引发剂不可食用,限制了其在生物培育肉中的应用^[81]。

上述生物 3D 打印方法都各有优缺点,如何合理选择、利用并开发新的打印工艺应用于生物培育肉的生产,是目前生物 3D 打印面临的问题。由于实际的肉是连接到肌腱纤维的排列组合,用于收缩和放松,因此,大阪大学学者开发了肌腱凝胶集成 3D 生物打印来构建肌腱样凝胶,该团队通过使用该技术组装细胞纤维来设计整块切肉状组织,总共构建了 72 根纤维,包括 42 块肌肉、28 个脂肪组织和 2 根毛细血管,并通过手工组装制造直径 5 mm、长度 10 mm 的牛排样肉,上述结果表明该技术是一项可用于制造类牛排培养肉的技术^[82]。

2.2 静电纺丝

静电纺丝技术是通过静电制备连续纳米纤维的一种技术,具有成本低廉、装置简单的优势,也是目前唯一的不需要借助额外的有机溶剂和温度控制即可生产纳米纤维的方法^[83]。2019 年,哈佛大学 Kit Parker 团队利用静电旋转喷射纺丝的工艺制得由猪源明胶制成的纳米纤维支架材料,并获得排列整齐的肌肉组织^[52]。目前,该技术在生物培育肉领域的研究尚处于起步阶段,发展潜力巨大。

2.3 脱细胞支架

最近把 dECM 作为一种改进的三维细胞打印工艺,因其促进细胞产生原位排列结构,故成为皮肤组织工程中支架材料的良好来源^[54]。根据来源不同,可划分为动物源脱细胞支架和植物源脱细胞支架。动、植物组织经脱细胞过程后,细胞和 DNA 等大部分免疫原性成分被去除,细胞外基质成分如胶原蛋白、糖胺聚糖、透明质酸和弹性蛋白在很大程度上被保留下来,是组织微环境支持细胞生长、黏附、增殖、迁移和分化的主要组成部分^[55]。与动物源脱细胞支架不同,植物组织本身具有的天然脉管系统和多孔结构,脱细胞后可以促进氧气和养分的运输。随着研究的不断深入,一些脱细胞的天然植物组织在满足可食用且脱细胞过程不含有毒材料的前提下,被用于生物培育肉支架材料的研发^[65]。

3 结论

通过三维培养材料和三维培养体系构建技术的结合可为细胞提供生肌的微环境,使生产生物培育肉成为可能。水凝胶类生物墨水是目前研究最广泛的一大类生物培育肉三维培养材料,一些脱细胞的天然植物组织因良好的生物相容性和可引导细胞排列的特点而成为潜在的新型生物培育肉支架材料。3D生物打印技术是现有生物培育肉三维培养体系构建方法中较为成熟的一种技术,在块状生物培育肉的生产方面具有较好的应用前景。目前应用于培育肉的支架材料和方法有限,在单一特点方面均各有利弊。在未来的研究中,开发可食用、可降解和生物相容性良好的三维培养材料,构建高效率的三维培养体系,是生物培育肉制造技术当前亟待解决的难点,也是未来的发展趋势。

参 考 文 献

- [1] ALEXANDRATOS, N, BRUINSMAJ. World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision: ESA Working paper No. 12-03[R]. Rome: FAO, 2012.
- [2] STEINFELD H G P J, WASSENAAR T. Livestock's long shadow: Environmental issues and options[R]. Rome: FAO, 2006.
- [3] MOTTET A, TEMPIO G. Global poultry production: current state and future outlook and challenges[J]. Worlds Poultry Science Journal, 2017, 73(2): 245-256.
- [4] 王守伟, 李石磊, 李莹莹, 等. 人造肉分类与命名分析及规范建议[J]. 食品科学, 2020, 41(11): 310-316.
WANG S W, LI S L, LI Y Y, et al. Classification of artificial meat and suggestions on normalization of nomenclature for related terms [J]. Food Science, 2020, 41(11): 310-316.
- [5] TUOMISTO H L, DE MATTOS M J T. Environmental impacts of cultured meat production[J]. Environmental Science & Technology, 2011, 45(14): 6117-6123.
- [6] EDMONDSON R, BROGLIE J J, ADCOCK A F, et al. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors[J]. Assay and Drug Development Technologies, 2014, 12(4): 207-218.
- [7] POST M J. Cultured beef: medical technology to produce food[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2014, 94(6): 1039-1041.
- [8] KIM D, KIM M, LEE J, et al. Review on multi-component hydrogel bioinks based on natural biomaterials for bioprinting 3D liver tissues[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2022, 10: 764682.
- [9] LEVI S, YEN F-C, BARUCH L, et al. Scaffolding technologies for the engineering of cultured meat: Towards a safe, sustainable, and scalable production [J]. Trends in Food Science & Technology, 2022, 126: 13-25.
- [10] 李石磊, 李莹莹, 李雨爽, 等. 培育肉的监管发展战略研究[J]. 食品科学, 2021, 42(21): 331-337.
LI S L, LI Y Y, LI Y S, et al. Regulation and developmental strategies of cultivated meat: an overview[J]. Food Science, 2021, 42(21): 331-337.
- [11] GU Z, FU J, LIN H, et al. Development of 3D bioprinting: From printing methods to biomedical applications[J]. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2020, 15(5): 529-557.
- [12] AHMANN K A, WEINBAUM J S, JOHNSON S L, et al. Fibrin degradation enhances vascular smooth muscle cell proliferation and matrix deposition in fibrin-based tissue constructs fabricated *in vitro* [J]. Tissue Eng Part A, 2010, 16(10): 3261-3270.
- [13] POLLOT B E, RATHBONE C R, WENKE J C, et al. Natural polymeric hydrogel evaluation for skeletal muscle tissue engineering[J]. Journal of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials, 2018, 106(2): 672-679.
- [14] KONING M, HARMSSEN M C, LUYN M, et al. Current opportunities and challenges in skeletal muscle tissue engineering[J]. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2010, 3(6): 407-415.
- [15] CUI X, BOLAND T. Human microvasculature fabrication using thermal inkjet printing technology [J]. Biomaterials, 2009, 30(31): 6221-6227.
- [16] SANZ-HORTA R, MATESSANZ A, JORCANO J L, et al. Preparation and characterization of plasma-derived fibrin hydrogels modified by alginate di-aldehyde[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(8): 4296.
- [17] 刘兵, 夏秀芳, 孔保华, 等. 猪血制备的纤维蛋白

- 原黏结剂对重组牛肉品质的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(13): 6.
- LIU B, XIA X F, KONG B H, et al. Effect of porcine fibrinogen as binder on the quality of restructured beef[J]. Food Science, 2017, 38(13): 6.
- [18] RODRIGUEZ-PASCUAL F, SLATTER D A. Collagen cross-linking: insights on the evolution of metazoan extracellular matrix[J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 37374.
- [19] STEPANOVSKA J, SUPOVA M, HANZALEK K, et al. Collagen bioinks for bioprinting: A systematic review of hydrogel properties, bioprinting parameters, protocols, and bioprinted structure characteristics[J]. Biomedicines, 2021, 9(9): 1137.
- [20] FERREIRA A M, GENTILE P, CHIONO V, et al. Collagen for bone tissue regeneration[J]. Acta biomaterialia, 2012, 8(9): 3191-3200.
- [21] MORI H, SHIMIZU K, HARA M. Dynamic viscoelastic properties of collagen gels with high mechanical strength[J]. Materials Science and Engineering: C, 2013, 33(6): 3230-3236.
- [22] BEIER J P, KLUMPP D, RUDISILE M, et al. Collagen matrices from sponge to nano: new perspectives for tissue engineering of skeletal muscle[J]. BMC Biotechnology, 2009, 9(1): 1-14.
- [23] KIM D, HWANGBO H, KIM G. Engineered myoblast-laden collagen filaments fabricated using a submerged bioprinting process to obtain efficient myogenic activities[J]. Biomacromolecules, 2021, 22(12): 5042-5051.
- [24] ZERNOV A, BARUCH L, MACHLUF M. Chitosan-collagen hydrogel microparticles as edible cell microcarriers for cultured meat[J]. Food Hydrocolloids, 2022, 129: 107632.
- [25] BODEN W E, PROBSTFIELD J L, ANDERSON T, et al. Niacin in patients with low HDL cholesterol levels receiving intensive statin therapy[J]. New England Journal of Medicine, 2011, 365(24): 2255-2267.
- [26] SZE J H, BROWNLIE J C, LOVE C A. Biotechnological production of hyaluronic acid: a mini review[J]. Biotech, 2016, 6(1): 67.
- [27] SUZUKI J, YAMAZAKI Y, GUANG L, et al. Involvement of ras and ral in chemotactic migration of skeletal myoblasts[J]. Molecular and Cellular Biology, 2000, 20(13): 4658-4665.
- [28] POLDERVAART M T, GOVERSEN B, DE RIJTER M, et al. 3D bioprinting of methacrylated hyaluronic acid (MeHA) hydrogel with intrinsic osteogenicity[J]. PLoS One, 2017, 12(6): e0177628.
- [29] BAJAJ P, SCHWELLER R M, KHADEMHOSEINI A, et al. 3D biofabrication strategies for tissue engineering and regenerative medicine [J]. Annual Review of Biomedical Engineering, 2014, 16(1): 247.
- [30] LI C, ZHENG Z, JIA J, et al. Preparation and characterization of photocurable composite extracellular matrix-methacrylated hyaluronic acid bioink [J]. Journal of Materials Chemistry B, 2022, 10(22): 4242-4253.
- [31] DAS D, ZHANG S, NOH I. Synthesis and characterizations of alginate- α -tricalcium phosphate microparticle hybrid film with flexibility and high mechanical property as biomaterials[J]. Biomedical Materials, 2018, 13(2): 025008.
- [32] AXPE E, OYEN M L. Applications of alginate-based bioinks in 3D bioprinting[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(12): 1976.
- [33] DRURY J L, MOONEY D J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications[J]. Biomaterials, 2003, 24(24): 4337-4351.
- [34] LIN Z, WU M, HE H, et al. 3D printing of mechanically stable calcium-free alginate-based scaffolds with tunable surface charge to enable cell adhesion and facile biofunctionalization[J]. Advanced Functional Materials, 2019, 29(9): 1808439.
- [35] JIA W, GUNGOR-OZKERIM P S, ZHANG Y S, et al. Direct 3D bioprinting of perfusable vascular constructs using a blend bioink[J]. Biomaterials, 2016, 106: 58-68.
- [36] PAN T, SONG W, CAO X, et al. 3D Bioplotting of gelatin/alginate scaffolds for tissue engineering: Influence of crosslinking degree and pore architecture on physicochemical properties [J]. Journal of Materials Science & Technology, 2016, 32(9): 889-900.
- [37] GAO T, GILLISPIE G J, COPUS J S, et al. Optimization of gelatin-alginate composite bioink printability using rheological parameters: a systematic approach[J]. Biofabrication, 2018, 10(3): 034106.
- [38] YANG X C, LU Z H, WU H Y, et al. Collagen-alginate as bioink for three-dimensional (3D) cell printing based cartilage tissue engineering[J]. Materi-

- als Science & Engineering C Materials for Biogical Applications, 2018, 83: 195–201.
- [39] BOLÍVAR – MONSALVE E J, CEBALLOS – GONZÁLEZ C F, BORRAYO–MONTAÑO K I, et al. Continuous chaotic bioprinting of skeletal muscle–like constructs[J]. *Bioprinting*, 2021, 21: e00125.
- [40] MEHTA F, THEUNISSEN R, POST M J. Adipogenesis from bovine precursors[M/OL]. New York: Humana Press, 2018: 111–125 [2022–03–20]. http://doi.org/10.1007/978–1–4939–8897–6_8.
- [41] XIONG J Y, NARAYANAN J, LIU X Y, et al. Topology evolution and gelation mechanism of agarose gel[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2005, 109(12): 5638–5643.
- [42] FEDOROVICH N E, DE WIJN J R, VERBOUT A J, et al. Three–dimensional fiber deposition of cell–laden, viable, patterned constructs for bone tissue printing[J]. *Tissue Engineering Part A*, 2008, 14(1): 127–133.
- [43] FORGET A, BLAESER A, MIESSMER F, et al. Mechanically tunable bioink for 3D bioprinting of human cells[J]. *Adv Healthc Mater*, 2017, 6(20): 1700255.
- [44] CHEN J, ZOU X. Self–assemble peptide biomaterials and their biomedical applications[J]. *Bioactive Materials*, 2019, 4: 120–131.
- [45] KOUTSOPOULOS S. Self –assembling peptide nanofiber hydrogels in tissue engineering and regenerative medicine: Progress, design guidelines, and applications[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2016, 104(4): 1002–1016.
- [46] ARAB W, KAHIN K, KHAN Z, et al. Exploring nanofibrous self–assembling peptide hydrogels using mouse myoblast cells for three–dimensional bioprinting and tissue engineering applications[J]. *Int J Bioprint*, 2019, 5(2): 74–82.
- [47] YUE K, SANTIAGO T D, ALVAREZ M M, et al. Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels[J]. *Biomaterials*, 2015, 73: 254–271.
- [48] LIU Y, WANG R, DING S J, et al. Engineered meatballs via scalable skeletal muscle cell expansion and modular micro –tissue assembly using porous gelatin micro –carriers[J]. *Biomaterials*, 2022, 287: 121615.
- [49] YING G, JIANG N, YU C, et al. Three–dimensional bioprinting of gelatin methacryloyl (GelMA) [J]. *Bio –Design and Manufacturing*, 2018, 1(4): 215–224.
- [50] GARCÍA–LIZARRIBAR A, FERNÁNDEZ–GARIBAY X, VELASCO –MALLORQUÍ F, et al. Composite biomaterials as long –lasting scaffolds for 3D bioprinting of highly aligned muscle tissue [J]. *Macromolecular Bioscience*, 2018, 18(10): e1800167.
- [51] DJAGNY K B, WANG Z, XU S. Gelatin: a valuable protein for food and pharmaceutical industries: review[J]. *C R C Critical Reviews in Food Technology*, 2001, 41(6): 481–492.
- [52] MACQUEEN L A, ALVER C G, CHANTRE C O, et al. Muscle tissue engineering in fibrous gelatin: implications for meat analogs[J]. *Npj Science of Food*, 2019, 3(1): 20.
- [53] CHANG K H, LIAO H T, CHEN J P. Preparation and characterization of gelatin/hyaluronic acid cryogels for adipose tissue engineering: *In vitro* and *in vivo* studies[J]. *Acta Biomaterialia*, 2013, 9(11): 9012–9026.
- [54] KIM W, LEE H, LEE J, et al. Efficient myotube formation in 3D bioprinted tissue construct by biochemical and topographical cues[J]. *Biomaterials*, 2020, 230: 119632.
- [55] XU J, ZHENG S, HU X, et al. Advances in the research of bioinks based on natural collagen, polysaccharide and their derivatives for skin 3D bioprinting[J]. *Polymers*, 2020, 12(6): 1237.
- [56] CHOI Y J, KIM T G, JEONG J, et al. 3D cell printing of functional skeletal muscle constructs using skeletal muscle–derived bioink[J]. *Adv Healthc Mater*, 2016, 5(20): 2636–2645.
- [57] GOULART E, DE CAIRES –JUNIOR L C, TELLES–SILVA K A, et al. 3D bioprinting of liver spheroids derived from human induced pluripotent stem cells sustain liver function and viability *in vitro* [J]. *Biofabrication*, 2019, 12(1): 015010.
- [58] MIRONOV V, VISCONTI R P, KASYANOV V, et al. Organ printing: tissue spheroids as building blocks[J]. *Biomaterials*, 2009, 30(12): 2164–2174.
- [59] YEO M, CHAE S, KIM G. An *in vitro* model using spheroids –laden nanofibrous structures for attaining high degree of myoblast alignment and differentiation [J]. *Theranostics*, 2021, 11(7): 3331–3347.
- [60] GERSHLAK, JOSHUA R, HERNANDEZ, et al.

- Crossing kingdoms: Using decellularized plants as perfusable tissue engineering scaffolds[J]. *Biomaterials*, 2017, 125: 13–22.
- [61] JDJ A, ASR A, GRG B. Decellularized spinach: An edible scaffold for laboratory-grown meat[J]. *Food Bioscience*, 2021, 41: 100986.
- [62] ROBBINS E R, PINS G D, LAFLAMME M A, et al. Creation of a contractile biomaterial from a decellularized spinach leaf without ECM protein coating: An *in vitro* study[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2020, 108(10): 2123–2132.
- [63] CAMPUZANO S, MOGILEVER N B, PELLING A E. Decellularized plant-based scaffolds for guided alignment of myoblast cells[J/OL]. *BioRxiv*, 2020: 2020.02.23.958686 (2020-02-24) [2022-02-18]. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.02.23.958686v1.full.pdf>.
- [64] CHENG YW, SHIWARSKI D J, BALL R L, et al. Engineering aligned skeletal muscle tissue using decellularized plant-derived scaffolds[J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2020, 6(5): 3046–3054.
- [65] ALLAN S J, ELLIS M J, DE BANK P A. Decellularized grass as a sustainable scaffold for skeletal muscle tissue engineering[J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2021, 109(12): 2471–2482.
- [66] HICKEY R J, MODULEVSKY D J, CUERRIER C M, et al. Customizing the shape and microenvironment biochemistry of biocompatible macroscopic plant-derived cellulose scaffolds[J]. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 2018, 4(11): 3726–3736.
- [67] DAY L. Proteins from land plants – Potential resources for human nutrition and food security[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2013, 32(1): 25–42.
- [68] ZELTINGER J, SHERWOOD J K, GRAHAM D A, et al. Effect of pore size and void fraction on cellular adhesion, proliferation, and matrix deposition[J]. *Tissue Engineering*, 2001, 7(5): 557–572.
- [69] BEN-ARYE T, SHANDALOV Y, BEN-SHAUL S, et al. Textured soy protein scaffolds enable the generation of three-dimensional bovine skeletal muscle tissue for cell-based meat[J]. *Nature Food*, 2020, 1(4): 210–220.
- [70] BAR-SHAI N, SHARABANI-YOSEF O, ZOLLMANN M, et al. Seaweed cellulose scaffolds derived from green macroalgae for tissue engineering[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 11843.
- [71] LAI C, ZHANG S J, WANG L Q, et al. The relationship between microstructure and *in vivo* degradation of modified bacterial cellulose sponges[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2015, 3(46): 9001–9010.
- [72] MODULEVSKY D J, CUERRIER C M, PELLING A E. Biocompatibility of subcutaneously implanted plant-derived cellulose biomaterials[J]. *PLoS One*, 2016, 11(6): e0157894.
- [73] MA P X. Scaffolds for tissue fabrication[J]. *Materials Today*, 2004, 7(5): 30–40.
- [74] GOH K, HEISING J K, YUAN Y, et al. Sandwich-architected poly (lactic acid)-graphene composite food packaging films[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2016, 8(15): 9994–10004.
- [75] CARLETTI E, MOTTA A, MIGLIARESI C. Scaffolds for tissue engineering and 3D cell culture[J]. *3D Cell Culture*, 2011, 695: 17–39.
- [76] MARGA F S, PURCELL B P, FORGACS G, et al. Edible and animal-product-free microcarriers for engineered meat; U.S. Patent 9,752,122[P]. 2017-09-05.
- [77] BODIOU V, MOUTSATSOU P, POST M J. Microcarriers for upscaling cultured meat production[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2020, 7: 10.
- [78] LI Y, LIU W, LI S, et al. Porcine skeletal muscle tissue fabrication for cultured meat production using three-dimensional bioprinting technology[J]. *Journal of Future Foods*, 2021, 1(1): 88–97.
- [79] GAO G, YONEZAWA T, HUBBELL K, et al. Inkjet-bioprinted acrylated peptides and PEG hydrogel with human mesenchymal stem cells promote robust bone and cartilage formation with minimal printhead clogging[J]. *Biotechnology Journal*, 2015, 10(10): 1568–1577.
- [80] CIDONIO G, GLINKA M, DAWSON J I, et al. The cell in the ink: Improving biofabrication by printing stem cells for skeletal regenerative medicine[J]. *Biomaterials*, 2019, 209: 10–24.
- [81] ZHENG Z, EGLIN D, ALINI M, et al. Visible light-induced 3D bioprinting technologies and corresponding bioink materials for tissue engineering: A review[J]. *Engineering*, 2021, 7(7): 966–978.
- [82] KANG D H, LOUIS F, LIU H, et al. Engineered

- whole cut meat-like tissue by the assembly of cell fibers using tendon-gel integrated bioprinting[J]. Nature Publishing Group, 2021, 12(1): 5059.
- [83] LEIDY R, XIMENA Q M. Use of electrospinning technique to produce nanofibres for food industries: A perspective from regulations to characterisations [J]. Trends in Food Science & Technology, 2019, 85: 92-106.

Research Progress of Scaffold Materials for Three-dimensional Cell Culture of Cultured Meat

Hu Haijuan, Li Yingying, Yang Feng, Wang Shouwei*

(China Meat Food Research Center, Beijing Academy of Food Sciences, Beijing 100068)

Abstract Cultured meat, as one of the most promising alternative protein meat technologies, has been reported to solve the problems of low conversion efficiency, high resource consumption and environmental pollution in the current aquaculture industry by cultivating animal cells *in vitro* to produce meat. To achieve cell growth and proliferation *in vitro*, the development of suitable three-dimensional cell culture scaffold materials and three-dimensional culture systems are of great importance to the construction of muscle tissue with real texture *in vitro*, which limits the developments and applications of cultivated meat. This review introduces and summarizes the application status of research progress on three-dimensional cell culture scaffold materials and three-dimensional fabrication methods for cultivated meat, and edible properties of those materials are analyzed, hoping to provide a reference for the future research and application of cultured meat.

Keywords cultured meat; three-dimensional cultivation; scaffold materials; fabrication methods