

## 细胞培养肉高效合成的生物学基础与技术挑战

关欣<sup>1</sup>, 周景文<sup>1</sup>, 王守伟<sup>2</sup>, 李春保<sup>3</sup>, 陈坚<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>江南大学 未来食品科学中心 江苏无锡 214122

<sup>2</sup>中国肉类食品综合研究中心 北京 100068

<sup>3</sup>南京农业大学食品科技学院 南京 210095

**摘要** 随着社会发展水平的不断提升,全球肉制品消耗量快速增长。细胞培养肉是农业食品科技的一场革命,随着国际上细胞培养肉工程化技术的迅速发展,国内在这方面的差距逐步显现。本文综述细胞培养肉高效合成的生物学基础,包括动物细胞功能维持与发育过程机制,关键生长因子解析与生物合成,细胞大规模低成本培养关键技术以及细胞培养肉食用品质提升的生物学过程,讨论细胞培养肉工业化制造面临的技术挑战,并对细胞培养肉技术的未来重点攻关方向进行展望,为实现细胞培养肉的可持续生物制造提供理论和实践依据。

**关键词** 细胞培养肉; 食品合成生物学; 工程化; 低成本; 大规模

文章编号 1009-7848(2024)05-0103-23 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2024.05.008

随着全球人口的增长,社会水平的提高及饮食结构的改变,居民对动物性产品消费需求持续增加,大规模养殖业导致的资源环境和公共健康等问题日益凸显。细胞培养肉(Cultured meat)也叫培育肉(Cultivated meat)或细胞肉(Cell-based meat),它是通过体外培养动物细胞的方式生产可供食用的肉制品<sup>[1-3]</sup>。细胞培养肉技术将肉产品的生产主体由完整的动物体简化为生命体最小单元——细胞,通过在受控条件下培养细胞来高效、精准地生产动物性食品,极大地提高资源利用率和物质转化率,并减少土地和水等资源消耗,在环境可持续性、动物福利和降低人畜共患病感染风险方面具有重要优势<sup>[4-5]</sup>。此外,细胞培养肉生产过程采用标准化的车间生产方式,会显著降低动物疾病传播的风险,消除抗生素、激素滥用。

目前,全球细胞培养肉行业发展迅速,国际代表性企业相继宣布进入规模化细胞培养肉生产阶段,正在建设年产万吨级别的大型细胞培养肉工厂。同时,美国、以色列等国企业均已推出商业化细胞培养鸡肉和牛肉产品,并获得了相关监管机构的上市前批准。与之相比,我国细胞培养肉研发起步稍晚,目前仍处于中试工艺研发到规模化制

造的过渡阶段,仍需投入大量研究以推动细胞培养肉的工业化发展。本文首先阐述细胞培养肉高效合成的生物学基础,包括动物细胞生长发育过程和调控机制,动物细胞关键生长因子解析与生物合成,动物细胞大规模低成本培养关键技术和细胞培养肉食用品质 4 个方面,然后分析细胞培养肉工程化面临的技术挑战,并提出细胞培养肉领域未来技术攻关方向,以期为我国细胞培养肉工程化技术研发和产业发展提供参考。

### 1 动物细胞功能维持、分化与生长过程机制解析

#### 1.1 动物细胞的分裂增殖和功能维持

细胞培养肉以动物细胞为生产用种子细胞,根据动物细胞分裂增殖和发育过程的分子机制,在体外进行细胞生长和功能的精准调控,是实现细胞大规模培养,进而生产细胞培养肉的先决条件<sup>[6]</sup>。目前,用于制备细胞培养肉的种子细胞主要分为动物胚胎干细胞、成体干细胞和成纤维细胞几大类别,其中成体干细胞可细分为肌肉干细胞、间充质干细胞等<sup>[7]</sup>。

胚胎干细胞来源于胚胎的内细胞团,具有自我更新和无限的增殖潜力,在不同的诱导条件下,可以分化为 3 个胚层的全部细胞类型,独特的多能性使其成为制备细胞培养肉的理想种子细胞之

收稿日期: 2024-04-15

基金项目: 中国工程院咨询项目(2023-XZ-79)

第一作者: 关欣,女,博士,副研究员

通信作者: 陈坚 E-mail: jchen@jiangnan.edu.cn

一。目前,除了小鼠胚胎干细胞与人胚胎干细胞外,已实现猪、牛、鸡、鱼等可食用动物胚胎干细胞系的构建。Zhu等<sup>[8]</sup>建立了猪胚胎干细胞的分离和培养技术体系,并在体外进行了300代以上的稳定传代。Lee等<sup>[9]</sup>通过滋养层细胞和白血病抑制因子(Leukemia inhibitory factor, LIF)的联合应用,成功实现了鸡胚胎干细胞的体外稳定扩增和功能维持。Nie等<sup>[10]</sup>成功进行了橄榄比目鱼胚胎干细胞系的分离与鉴定,并在18个月的培养时间内对该细胞系进行了61次的传代。在胚胎干细胞的建系和培养中,常使用小鼠胚胎成纤维细胞作为饲养层细胞,其分泌的多种生长因子和细胞外基质成分对胚胎干细胞多能性的维持具有重要作用<sup>[11]</sup>。由于饲养层细胞具有局限性,近年来无饲养层培养体系也被成功研发。例如,Soto等<sup>[12]</sup>通过优化牛胚胎干细胞的培养条件,极大地简化了培养基组分,并实现了牛胚胎干细胞的无饲养层培养。Ho等<sup>[13]</sup>为斑马鱼卵裂球胚胎干细胞样细胞系开发了无饲养层培养体系,成功实现了该细胞系在体外的长期培养与干性维持。

肌肉干细胞是肌肉组织中的专能干细胞,具有较强的分化生成肌纤维的能力。肌肉干细胞的体外分裂增殖具有以下特点:①细胞本身贴壁能力较弱,需要在培养体系中添加Matrigel、胶原蛋白等细胞外基质成分以促使它们在培养皿上黏附和铺展;②常规培养条件下细胞的增殖能力较弱,通常需要添加生长因子,如bFGF、IGF-1等以促进细胞在体外的快速增殖;③体外培养中细胞易衰老并丧失功能,随着培养时间的延长,细胞的成肌分化能力明显下降。目前肌肉干细胞的研究重点集中在细胞增殖和功能维持的调控机制方面。Fang等<sup>[14]</sup>发现维生素C具有促进猪肌肉干细胞增殖并维持成肌分化潜能的作用,进一步揭示了维生素C作用的分子机理,涉及PI3K/Akt/mTOR/P70S6K信号通路的激活。

间充质干细胞是一类多能性的成体干细胞,存在于许多成体组织中,其具有分化生成脂肪细胞的能力,因此也是制备细胞培养肉的常用种子细胞<sup>[15]</sup>。与肌肉干细胞相比,间充质干细胞的贴壁能力虽然较强,但是同样存在体外扩增能力有限,分化能力随培养时间逐渐下降的问题。刘裴裴等<sup>[16]</sup>

通过探究*N*-乙酰-*L*半胱氨酸(*N*-Acetyl-*L*-cysteine, NAC)对猪脂肪间充质干细胞氧化应激的调控作用,证明1 mmol/L NAC可以降低活性氧的生成,并有效促进细胞的增殖。吴雅廷等<sup>[17]</sup>发现在脂肪间充质干细胞培养体系中添加25 μmol/L柚皮素,能提高细胞增殖速度并解析了相关机制。此外,构建永生化间充质干细胞系有利于细胞培养肉的大规模生产,目前针对人和犬类脂肪间充质干细胞已有相关研究<sup>[18-19]</sup>,然而,对于牛、猪等动物来源间充质干细胞的永生化研究比较少。

成纤维细胞是一种多样化的间质细胞,主要分为4种类型:①分泌许多与组织细胞外空间相同的结构和信号大分子的细胞;②在应对组织损伤时,采用瞬时收缩的肌成纤维细胞表型;③作为组织常驻干细胞的信号龕细胞;④作为专门分化的间质细胞的祖细胞<sup>[20]</sup>。成纤维细胞的增殖速度较快,对培养基底有较强的黏附力。同时,成纤维细胞自身可合成胶原蛋白、纤连蛋白等,将其添加到培养肉中可以增强培养肉的质地和弹性<sup>[21]</sup>。此外,成纤维细胞也具有成脂分化能力,Pasitka等<sup>[22]</sup>通过在培养基中添加卵磷脂诱导成纤维细胞在悬浮状态下分化成脂肪细胞,再混合植物基蛋白成分制备了细胞培养肉产品。

## 1.2 诱导分化生成肌纤维、脂肪

### 1.2.1 成肌分化过程机制和调控策略

在体内,成肌分化生成肌纤维的过程包括:静息肌肉干细胞的激活、增殖和分化为成肌细胞,多个细胞融合形成肌管,肌管进一步成熟形成肌纤维(图1)。静息的肌肉干细胞特征之一是高表达Pax7和Pax3,当其受到刺激或损伤后,肌肉干细胞被迅速激活。激活后的肌肉干细胞进行不对称分裂,一部分子代细胞恢复静息状态以维持肌肉干细胞库,另一部分子代细胞进入快速增殖期,并上调Myf5和MyoD的表达。随后,细胞退出细胞周期并启动分化程序,MyoG与Mrf4等表达升高,细胞相互融合形成肌管,肌管逐渐成熟形成肌纤维<sup>[2,23-24]</sup>。

在成肌分化的过程中,成肌细胞发生一系列的变化,包括肌肉特异性基因的表达,细胞形态的改变,细胞周期退出以及相关信号通路调控因子表达水平的改变,最终决定了成肌细胞的分化命运。在体外培养过程中,通常利用含有低浓度马血

清的培养基诱导肌肉干细胞进行成肌分化,然而,该条件下的肌纤维形成效率、分化率、细胞融合率、蛋白质表达量不高。为了满足细胞培养肉生产的要求, 研究人员进行细胞分化融合机制的基础研究, 开发了多种调控手段以提高成肌分化的效率。据报道, IGF-1 通过激活 Akt/mTOR 途径积极参与成肌细胞的增殖与分化, 提高 MyoG 的表达<sup>[25]</sup>。IGF-1 还调节线粒体生物合成和线粒体自噬, 通过调控线粒体重塑促进成肌分化<sup>[26]</sup>。在此基础上, 多种天然化合物被报道具有促进肌纤维生成和成

熟的作用。例如, 木犀草素可以激活 PI3K/Akt/mTOR 通路, 对猪成肌细胞的迁移和分化具有积极作用, 并上调 MyoG 和 MyHC 的表达<sup>[27]</sup>。柚皮素通过激活雌激素受体  $\beta$  上调 IGF-1/Akt/mTOR 通路, 从而提高成肌细胞的分化效率, 明显提高生成的肌管含量和成熟度<sup>[28]</sup>。原花青素和二醛壳聚糖通过促进牛成肌细胞从 G1 期向 S 期的转变以及促进细胞在 G2 期的分裂来促进细胞增殖, 同时原花青素和二醛壳聚糖联合上调 MYH3 的表达促进了肌纤维的生成<sup>[29]</sup>。

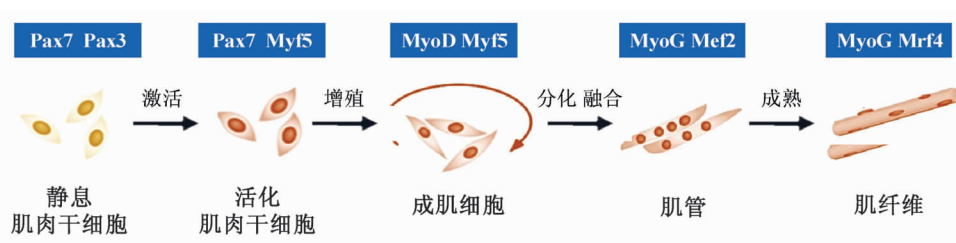


图 1 成肌分化过程及相关调节因子

Fig.1 Myogenic differentiation process and related regulatory factors

1.2.2 成脂分化过程机制和调控策略 成脂分化过程大致可分为 3 个阶段, 首先, 间充质干细胞进行增殖并将自身限制在脂肪细胞分化谱系中, 形成脂肪祖细胞; 随后, 脂肪祖细胞持续增殖并定向分化形成前体脂肪细胞, 细胞形态由成纤维状变圆, 开始出现少量小脂滴; 最后, 前体脂肪细胞生长停滞, 终末分化, 通过摄取游离的脂肪酸积累脂质, 小脂滴不断膨大形成大脂滴, 最终形成功能性成熟脂肪细胞(图 2)。

成脂分化过程中受到多种调节因子的调控, 如: 前脂肪细胞因子-1(Pref-1)、CCAAT/增强子结合蛋白(C/EBP $\alpha$ )、过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR $\gamma$ )、固醇调节元件结合蛋白(SREBP-1)等。

据报道, PPAR $\gamma$  是体内外脂肪生成的关键调控分子, 过表达 PPAR $\gamma$  能够使成纤维母细胞有效分化为成熟脂肪细胞<sup>[30]</sup>。此外, C/EBP $\alpha$  和 PPAR $\gamma$  能够共同诱导成脂过程中脂滴的形成和脂肪相关蛋白的表达<sup>[31]</sup>。黄芪多糖<sup>[32]</sup>、花生四烯酸<sup>[33-34]</sup>、 $\alpha$ -亚麻酸和亚油酸<sup>[35]</sup>等多种天然产物已被证实可显著促进脂源性分化。在培养体系中添加亚油酸和  $\alpha$ -亚麻酸可以抑制前体脂肪细胞增殖, 促进前体脂肪细胞的成脂分化<sup>[35]</sup>。大豆卵磷脂可激活 PPAR $\gamma$ , 诱导永生化成纤维细胞的脂肪生成<sup>[22]</sup>。此外, Wu 等<sup>[36]</sup>利用 m6A 去甲基化酶 FTO 实现了猪脂肪细胞的高效分化, 其作用机理涉及 JAK2-STAT3-C/EBP $\beta$  通路、克隆增殖和细胞自噬等多条途径。

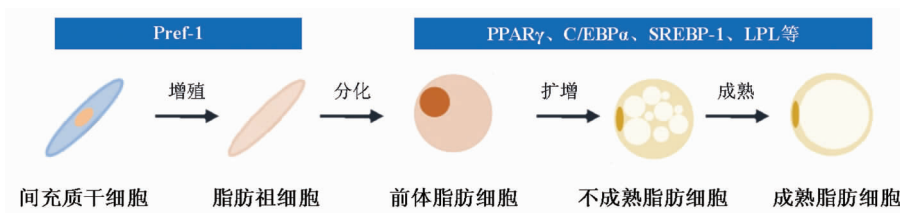


图 2 成脂分化过程及相关调节因子

Fig.2 Adipogenic differentiation process and related regulatory factors

### 1.3 动物细胞的衰老和永生化

1.3.1 细胞衰老的影响因素 细胞衰老是一种持久的、不可逆的生长停滞状态,其主要特征为细胞形态结构和功能的退行性变,包括细胞体积变大,细胞膜通透性降低,细胞核凹陷,细胞周期停滞,细胞代谢能力降低等<sup>[37]</sup>。一般来说,体外培养的原代细胞传至10代左右时就会出现生长停滞,部分细胞衰老死亡的现象。细胞衰老受自身先天性因素和外界环境因素的共同影响。例如,细胞复制次数增多和端粒缩短会引起细胞复制性衰老<sup>[38]</sup>。此外,在体外培养过程中细胞代谢产物、自由基积累过多以及一些物理或者化学刺激会导致DNA损伤,持续的DNA损伤积累会诱发细胞衰老<sup>[39]</sup>。同时,衰老细胞可以分泌衰老相关的分泌表型(Senescence associated secretory phenotypes, SASP)因子,从而诱发相邻细胞衰老<sup>[37]</sup>。

1.3.2 细胞永生机理和策略 细胞进入衰老期(M1)期后自身的肿瘤抑制蛋白p53、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂(p16)等被激活,使得细胞周期G1检查点发出信号,DNA合成停止,进而细胞不再分裂增殖。在某些情况下,如病毒的导入,原癌基因或抑癌基因突变等可能会使某些细胞绕过M1期获得无限增殖能力。

目前实现细胞永生化的途径主要包括:①通过外源导入端粒酶逆转录酶(TERT)或者激活细胞自身TERT使端粒长度得到恢复,细胞可以继续增殖分裂,从而获得永生的能力<sup>[40]</sup>。Stout等<sup>[41]</sup>通过过表达牛端粒酶逆转录酶(TERT)和细胞周期蛋白依赖性激酶4(CDK4)构建永生牛肌肉干细胞系(iBSC),该细胞系可快速增殖并在体外超过120次倍增,保留了肌源性分化的能力。②抑制或者突变细胞周期相关蛋白如p53、p16、pRB等,使细胞不进入细胞周期,逃逸衰老阶段。Cheng等<sup>[42]</sup>利用过表达SVT40的慢病毒感染猪脂肪前体细胞,构建了1株可以传代培养超过40代而不会丧失分化能力的永生猪前脂肪细胞。③细胞在体外培养过程中自发永生,该过程不需要额外诱导而自发度过危机期,从而获得永生能力。Pasitka等<sup>[22]</sup>从鸡受精胚胎中分离出来的鸡成纤维细胞随着体外培养时间增加,细胞群体倍增时间延长至500h左右,细胞体积开始增大并伴随细胞空泡

出现,衰老特征明显。继续培养后,有极少数细胞度过危机期,细胞恢复增殖,实现永生。

## 2 动物细胞关键生长因子解析与生物合成

### 2.1 动物细胞关键生长因子

2.1.1 细胞因子类 细胞因子(Cytokine)是一类由免疫原、丝裂原或其它刺激诱导免疫细胞等多种细胞合成和分泌的具有广泛生物学活性的可溶性小分子蛋白,参与免疫应答与免疫调节,具有调节固有免疫和适应性免疫、细胞生长、分化以及损伤组织修复等多种功<sup>[43-45]</sup>。细胞因子在体内通过旁分泌、自分泌或内分泌等方式发挥作用,同时具有多效性、重叠性、拮抗性、协同性等多种生理特性<sup>[46-47]</sup>。在体外,细胞因子通过与细胞表面特异性受体结合并激活信号转导通路,发挥调控细胞生长、增殖或分化的功能<sup>[48-50]</sup>。

根据细胞因子主要功能不同,可以将其分成7大类:白细胞介素、集落刺激因子、干扰素、肿瘤坏死因子、转化生长因子- $\beta$ 家族、生长因子和趋化因子家族,具体见表1所示。

虽然细胞因子种类繁多,但是它们具有很多相似的作用特点<sup>[56]</sup>,如微量,高效,作用时间较短,多种细胞因子间存在协同和拮抗作用等。同时,细胞因子通过调控一些关键途径来发挥调控细胞生长和功能等作用,主要途径包括:受体介导的信号传导途径,细胞周期蛋白激酶调控,细胞凋亡途径调控,免疫调节和细胞能量代谢过程调控等。Lei等<sup>[57]</sup>在猪肌肉干细胞培养基中添加生长因子LR<sup>3</sup>-IGF-1、PDGF-BB、bFGF和EGF,促进了肌肉干细胞的长期增殖,培养28d后细胞扩增 $6.31 \times 10^7$ 倍。类似地,牛肌肉干细胞的生长和增殖可以在含有细胞因子IL-6、bFGF、VEGF、IGF-1和PDGF-BB的无血清培养基中生长增殖<sup>[58]</sup>。Song等<sup>[59]</sup>发现添加细胞因子bFGF可以促进猪脂肪间充质干细胞的增殖和成脂分化,且在培养基中添加5ng/mL bFGF时,该细胞成脂分化能力提高了1倍。因此,细胞因子对细胞培养肉种子细胞的体外生长发育具有重要调控作用,是用于细胞培养肉生产的细胞培养基的关键组分。

2.1.2 营养蛋白类 除细胞因子外,动物细胞培养基中还需添加营养蛋白类成分,主要包括白蛋

表 1 细胞因子的分类及功能

Table 1 Classification and function of cytokines

主要分类	主要功能	主要代表
白细胞介素(Interleukin, IL)	调节免疫、造血及炎症过程 <sup>[51]</sup>	IL1~IL38
集落刺激因子(Colony stimulating factor, CSF)	刺激不同发育阶段的造血干细胞和祖细胞增殖分化,促进细胞成熟 <sup>[52]</sup>	G(粒细胞)-CSF、M(巨噬细胞)-CSF、GM(粒细胞、巨噬细胞)-CSF、Multi(多重)-CSF等
干扰素(Interferon, IFN)	抗病毒、抗肿瘤和免疫调节	IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 和IFN- $\gamma$
肿瘤坏死因子(Tumor necrosis factor, TNF)	杀伤肿瘤细胞,参与发热和炎症的發生	TNF- $\alpha$ 和TNF- $\beta$
转化生长因子- $\beta$ 家族(Transforming growth factor- $\beta$ family, TGF- $\beta$ family)	调节细胞生长、分化和免疫	TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2、TGF- $\beta$ 3以及骨形成蛋白(BMP)等
生长因子(Growth factor, GF)	调控细胞生长发育、肿瘤发生、血管形成、机体免疫、细胞分化和凋亡 <sup>[53-54]</sup>	表皮生长因子(EGF)、血小板衍生生长因子(PDGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)等
趋化因子家族(Chemokine family)	诱导细胞定向迁移 <sup>[55]</sup>	C-X-C/ $\alpha$ 亚族、C-C/ $\beta$ 亚族、CX3C亚族等

白、转铁蛋白和胰岛素等,它们对细胞体外黏附和生长具有重要作用。

白蛋白是人体血浆中最主要的蛋白质,约占血浆蛋白的60%,白蛋白在机体中具有重要的生理功能:①维持血浆胶体渗透压的恒定;②与体内许多难溶性小分子有机物和无机离子可逆结合形成易溶性复合物,作为这些物质在血液循环中运输形式;③保证细胞内液、细胞外液与组织液间的交流;④对球蛋白起到胶体保护的稳定作用;⑤具有黏性、胶质性,在人体内遇到重金属离子时,会自动与重金属离子结合,起到解毒作用<sup>[60]</sup>。白蛋白作为血清的重要成分,在动物细胞培养中发挥多种作用,如脂质运输、药物结合、金属螯合和抗氧化等<sup>[61]</sup>。因此,白蛋白是无血清培养基中的重要添加物质<sup>[62]</sup>。研究表明,重组白蛋白和血源白蛋白在动物细胞培养过程中作用效果无明显差异<sup>[63]</sup>。

转铁蛋白是血浆中一种负责运载铁离子到成熟红细胞,供合成血红蛋白的非血红素铁结合蛋白<sup>[64]</sup>,具有调节细胞生长、增殖和免疫系统的功能<sup>[65]</sup>。因此,转铁蛋白是无血清培养基的关键补充剂之一,其主要功能是促进细胞外铁的储存和运输,以及作为重要的细胞外抗氧化剂,紧密与铁结合,避免游离铁催化自由基的产生。研究发现,转铁蛋白的添加帮助人多能干细胞从TeSR-E8培

养基转移到简单的心脏分化培养基,并成功启动中胚层分化,同时保护细胞避免因更换培养基而引起的大量细胞死亡<sup>[66]</sup>。

胰岛素是由胰脏内的胰岛 $\beta$ 细胞受内源性或外源性物质刺激而分泌的一种蛋白质激素,是机体内唯一降低血糖的激素,同时促进糖原、脂肪、蛋白质合成。在体内,胰岛素对许多细胞的生命活动起到重要调控作用,如加速葡萄糖的利用和抑制葡萄糖的生成,抑制脂肪的分解和促进脂肪的合成和贮存,促进蛋白质的合成并阻止蛋白质的分解,促进钾离子和镁离子穿过细胞膜进入细胞内,促进脱氧核糖核酸(DNA)、核糖核酸(RNA)及三磷酸腺苷(ATP)的合成等。因此,胰岛素能够调控动物细胞的体外增殖或分化。研究表明,在无血清培养基中添加胰岛素和地塞米松后能显著提高肌卫星细胞的分化率,且能高效诱导肌卫星细胞分化为肌管<sup>[67]</sup>。

2.1.3 基质蛋白类 细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)是细胞外微环境的基础,具有一定的生物学活性,在调控细胞增殖、分化、迁移、凋亡等细胞活动中发挥着重要的作用<sup>[68-70]</sup>。ECM中富含胶原蛋白、非胶原糖蛋白、弹性蛋白、蛋白聚糖及各种细胞因子等,其中胶原蛋白和弹性蛋白主要起结构支撑作用,非胶原糖蛋白起粘连作用<sup>[71]</sup>,

而肉类中的这些蛋白会影响肉的颜色、风味、滋味以及加工特性等<sup>[72]</sup>。

胶原蛋白是细胞外基质的骨架结构,也是ECM的主要成分,其化学本质为糖蛋白,为不溶性纤维型蛋白质,占人体蛋白质总量的30%。胶原蛋白是由3条肽链组成的三螺旋结构,存在于皮肤、韧带、结缔组织中,具有一定的机械功能,在很大程度上用来维持组织和器官结构完整性<sup>[73]</sup>。目前,主要通过从猪、牛、羊、水产等动物组织提取生产胶原蛋白<sup>[74-75]</sup>,其在医药、食品、化妆品等领域已得到广泛应用<sup>[76]</sup>。同时,胶原蛋白作为细胞培养皿表面的涂层,能够增强细胞黏附和增殖,或促进细胞形成特定形态和功能蛋白的表达,特别在内皮细胞、干细胞、肌细胞等的体外培养中发挥重要作用。此外,高浓度的胶原蛋白可应用于细胞三维培养,提高基质硬度和支持物完整性,因此在细胞培养肉的三维组织成型过程中已有广泛应用<sup>[77]</sup>。

非胶原糖蛋白包括层粘连蛋白(Laminins, LN)和纤连蛋白(Fibronectin, FN)等,它们主要由肝细胞、成纤维细胞、巨噬细胞等分泌,作为细胞与ECM的媒介,调节细胞的生长、迁移、分化和黏附等<sup>[78-79]</sup>。层粘连蛋白在早期胚胎发育和器官成熟中起着至关重要的作用,其异构体的分布具有组织特异性,提示特定的层粘连蛋白参与组织功能<sup>[80]</sup>。纤连蛋白可提高多种细胞的贴壁率、融合率,使细胞形态结构良好,代谢率增强,提高DNA、RNA及蛋白质合成速度<sup>[81]</sup>。此外,这些糖蛋白也是细胞与材料相互作用的纽带,其会与细胞发生特异性黏附,通过黏着斑和细胞骨架产生细胞牵拉力,使细胞感知微环境的力学特性,同时将力学信号转导为细胞能够识别的生化信号<sup>[82]</sup>。

弹性蛋白是一种水不溶性、高交叉度的水解蛋白,在生物体内的含量仅次于胶原蛋白,其中非极性氨基酸约占95%,具有组织弹性,为组织提供支撑力和回弹力<sup>[83-84]</sup>。弹性蛋白与纤维结合后高度交联,半衰期长,热稳定性强并且具有抗酶解能力<sup>[85]</sup>。同时,弹性蛋白还能够调节细胞增殖、分化、迁移和黏附等,具有重要的生物学功能<sup>[86]</sup>。Hinek<sup>[87]</sup>发现在平滑肌细胞表面存在能够识别弹性蛋白、层粘连蛋白 $\beta$ -半乳糖苷以及IV型胶原的受体,该受体的另一端连接膜蛋白,将细胞内表达的原

弹性蛋白传递到细胞表面并固定在受体上,进而诱导弹性蛋白在细胞周围有序组装成弹性纤维。Zheng等<sup>[88]</sup>通过在花生拉丝蛋白支架上培养猪平滑肌细胞,制作了细胞培养猪肉样品,并发现分化后的平滑肌细胞能够产生大量的弹性蛋白和III型胶原蛋白,这改变了原来支架的硬度和咀嚼性,使培养肉的口感和品质更好。

## 2.2 关键生长因子的生物合成

利用微生物表达系统进行动物细胞关键生长因子的低成本生产,对细胞培养肉的工业化发展具有重要意义。微生物表达系统包括原核生物表达系统和真核生物表达系统,前者主要是大肠杆菌表达系统,后者主要是酵母表达系统。

2.2.1 大肠杆菌表达系统 大肠杆菌表达系统是最常用的表达系统。大肠杆菌作为原核生物,也是第1个用于表达外源蛋白的宿主菌,具有遗传背景清楚,培养条件简单,生长较快,便于实际操作,成本低以及抗污染能力强等特点,因此在外源蛋白的表达中应用最为广泛<sup>[89]</sup>。目前,已有很多成功案例利用大肠杆菌表达动物细胞关键生长因子、营养蛋白和基质蛋白,例如:Ma等<sup>[90]</sup>和Ko等<sup>[91]</sup>成功在大肠杆菌中表达表皮生长因子和血管内皮生长因子;Nguyen等<sup>[92]</sup>通过添加融合标签,实现了白蛋白在大肠杆菌中的可溶性表达,且纯化后的回收率较高;吕丹等<sup>[93]</sup>实现了重组人胰岛素在大肠杆菌中的可溶性表达,经镍柱纯化后得到1.059 g/L重组蛋白;李瑛琦等<sup>[94]</sup>在大肠杆菌中获得纯度约为91%的类人胶原蛋白;赵轶君等<sup>[95]</sup>利用大肠杆菌成功表达了重组类人弹性蛋白,产量达宿主细胞可溶性蛋白总量的28.3%;周晗等<sup>[96]</sup>通过大肠杆菌表达系统表达的重组人纤连蛋白表达量高达33.6%。

虽然大肠杆菌表达系统应用较为广泛,但是也有一些缺点:①没有真核生物转录后加工和进行mRNA剪接的功能;②没有真核生物翻译后修饰(糖基化、磷酸化等)的功能,可能导致表达出的蛋白质无生物学活性;③表达的蛋白质通常不可溶,形成包涵体;④大肠杆菌可能会产生内毒素,混杂在终产物里。因此,大肠杆菌表达系统在细胞培养肉的应用领域具有一定局限性。

2.2.2 酵母表达系统 酵母表达系统作为一种真

核表达系统,具有表达水平高,易培养,外源蛋白活性高,无内毒素残留等优势,在基因工程和生物医药等领域中得到广泛的应用<sup>[97]</sup>。常用的酵母表达系统有毕赤酵母表达系统和酿酒酵母表达系统。

毕赤酵母表达系统是目前应用最广泛的酵母表达系统,已广泛应用于人和动植物来源的外源蛋白的生产<sup>[98]</sup>。此外,毕赤酵母可以进行高密度发酵,在普通发酵的基础上,通过优化并调控细胞的发酵条件,使细胞在高细胞密度下产生更多的外源蛋白<sup>[99]</sup>。近年来,在医药蛋白领域中,已有多种蛋白通过毕赤酵母表达实现规模制备<sup>[100]</sup>。例如:Liu 等<sup>[101]</sup>和 Dagar 等<sup>[102]</sup>成功实现在毕赤酵母中表达肝细胞生长因子和白细胞介素-3。王爽<sup>[103]</sup>在毕赤酵母中实现了 TGF- $\beta$ 3 的高效表达,纯化后得到具有生物学活性的 TGF- $\beta$ 3。Maity 等<sup>[104]</sup>通过毕赤酵母在摇瓶水平获得 1 g/L 的白蛋白,在生物反应器中达到 300 mg/L/d 的水平。黄建民等<sup>[105]</sup>发明了一种重组人源纤连蛋白在毕赤酵母中的表达方法,在护肤品和医药领域具有广泛的应用前景。蔡思泽等<sup>[106]</sup>构建了毕赤酵母四拷贝胶原蛋白重组菌株,通过高密度发酵获得 0.45 g/L 具有抗氧化活性的胶原蛋白。

酿酒酵母作为一种模式生物,具有生长迅速,遗传背景清晰,易于操作和低成本等优点,是一种公认安全的微生物,因此常被用于食品发酵<sup>[107]</sup>。酿酒酵母表达系统也是一种重要的外源蛋白表达系统,在食品工业和药物开发领域中有广泛应用。以酿酒酵母为表达宿主,能够实现表达产物的可分泌表达,并且不产生内毒素,食品安全风险低<sup>[108]</sup>。例如,Cho 等<sup>[109]</sup>实现了利用酿酒酵母表达系统成功表达了人 G-CSF,在摇瓶水平上的产量为 54.1 mg/L。Moeozkina 等<sup>[110]</sup>通过酿酒酵母得到高达 50 mg/L 的力生长因子 (Mechano-growth factor, MGF)。Lei 等<sup>[111]</sup>利用酿酒酵母构建了一个细胞因子联合表达系统,并且通过启动子优化,内源性蛋白酶敲除,基因表达顺序优化,酵母基因组上联合表达和补料发酵,实现了 4 种细胞因子 (LR3-IGF-1、PDGF-BB、bFGF 和 EGF) 在酿酒酵母中的联合表达,总产量达到 18.35 mg/L。在此基础上,将表达 4 种细胞因子的重组菌株经物理破碎后获

得酵母裂解物,其具有促进猪肌肉干细胞快速增殖的作用,这种方法能够大大降低细胞因子的生产成本,在细胞培养肉领域具有良好的应用前景。

### 3 动物细胞大规模低成本培养关键技术

#### 3.1 无血清培养基的设计和优化

血清为动物细胞的体外生长提供必需的营养物质,促进细胞的增殖和功能维持。然而在实际应用过程中,血清存在价格昂贵,批次差异大,易造成外源污染等问题,难以保证其稳定性<sup>[112]</sup>。随着细胞培养肉行业对动物细胞培养的规模、效率与安全性的要求逐渐增加,研制低成本的无血清培养基十分重要。无血清培养基主要由基础培养基和补充因子两部分组成<sup>[113]</sup>。其中,补充因子主要有必需氨基酸、维生素、细胞因子、促黏附因子、脂质、微量元素等。由于补充因子的多样性以及不同细胞间的代谢差异,因此为更好地实现无血清培养基的设计与开发,有必要采取合理的设计及优化策略。

目前,常见的无血清培养基设计与优化方法主要有统计学实验设计、细胞代谢流分析以及化学计量法。Dai 等<sup>[114]</sup>以 C2C12 为模型细胞,利用 Plackett-Burman 设计,开发了一种用于体外大规模扩增成肌细胞的无血清培养基,该培养基可以支持 C2C12 的短期增殖和长期传代,同时保持良好的肌原性分化潜力。在微载体无血清培养系统中,成肌细胞的实际扩增倍数在 7 d 后可达到 43.55 倍。Stig 等<sup>[115]</sup>为探究牛卫星细胞在无血清条件下的增殖,通过试验设计 (DOE) 和响应面方法 (RSM),开发了一种配方简单的无血清培养基。陈敏等<sup>[116]</sup>使用开发出的 BHK-21 悬浮细胞无血清培养基,分析代谢通量,检测关键营养成分,优化不同组分浓度,监测和评估细胞代谢活动,最终优化后的 BHK-21 无血清培养基能够支持细胞高密度培养和稳定传代,最高活细胞密度可达  $1.78 \times 10^7$  cells/mL。

无血清培养基虽已在理论基础和应用实践中取得一定成果,但其在应用上缺乏普适性,一种无血清培养基配方基本只满足一种细胞的生长需求。此外,补充因子的价格比较昂贵,导致某些无血清培养基的成本极其高昂,不适用于细胞培养

肉的大规模生产。需要综合考虑作用效果、成本、稳定性等多方面因素进行无血清培养基的设计和优化。近年来,随着代谢组学和蛋白质组学等技术的不断进步,无血清培养基资源共享在线数据库的建立,以及合成生物学技术的迅速发展,多学科交叉的培养基组分研究方法和高效低成本的培养基原料制备工艺将加速无血清培养基的设计和优化,从而适用于细胞培养肉的工业化生产<sup>[113]</sup>。

### 3.2 生物反应器培养工艺的高效构建

建立生物反应器工艺对于扩大细胞培养规模,进而实现细胞培养肉的工业化生产至关重要。细胞的体外培养过程十分复杂,需要考虑物理参数(转速和温度等)、化学参数(如pH值、渗透压、溶解氧、二氧化碳及代谢物等)以及生物参数(如细胞密度、活力、细胞周期等)等多方面因素,这些都会对细胞培养肉终产品的质量产生重要影响<sup>[117]</sup>。因此,根据细胞的生长特点选择合适的培养方式和生物反应器类型,优化细胞培养工艺和参数,同时开发流加或补料等策略提高细胞培养密度,以实现细胞的高效、低成本培养和细胞培养肉的规模化生产。质量源于设计理念(QbD)是近年来提出的细胞培养工艺和参数研究策略,有助于确保生产工艺稳定性和可放大性(图3)。基于QbD的工艺研究基本流程如下:①对细胞培养过程进行风险评估,确定影响工艺和质量的关键参数<sup>[118]</sup>;②

通过响应面中心复合试验设计(Central composite design, CCD)验证这些参数,研究关键工艺参数的交互作用及对工艺属性和关键质量属性的影响,建立关键工艺参数的设计空间;③通过多变量数据分析(MVDA)和过程分析技术(PAT)考察工艺的稳定性。

生物反应器培养工艺常见的操作模式有批次式培养、流加培养和灌注培养。批次式培养操作简单,周期短,污染风险小,然而,无法解决营养耗竭和有害代谢废物累积的问题,因此细胞密度和产物浓度不高。流加培养可使细胞生长至更高密度并维持更长的生产时间,然而,不能避免有害代谢物的积累,可能增加培养液的渗透压。灌注培养可以保持稳定的培养状态,避免代谢废物累积,获得高细胞密度和良好的细胞生理状态,然而,细胞对培养基中营养的利用不彻底<sup>[119]</sup>。因此,在细胞大规模培养中,需要实时监控各种物理、化学和生物学参数,以模拟体内环境并优化工艺,包括温度、酸碱度、溶氧、营养物质和代谢副产物浓度等。此外,还可以通过关注生化参数,如细胞的生长速率和营养物质的消耗速率等,来了解细胞的生长状态和代谢特征。随着各种新兴分析手段的出现,如电子显微镜和生化分析仪,人们能够在线检测和控制这些参数,从而更精准地调整细胞生理状态,保证工艺的高效性和品质的稳定性<sup>[120]</sup>。

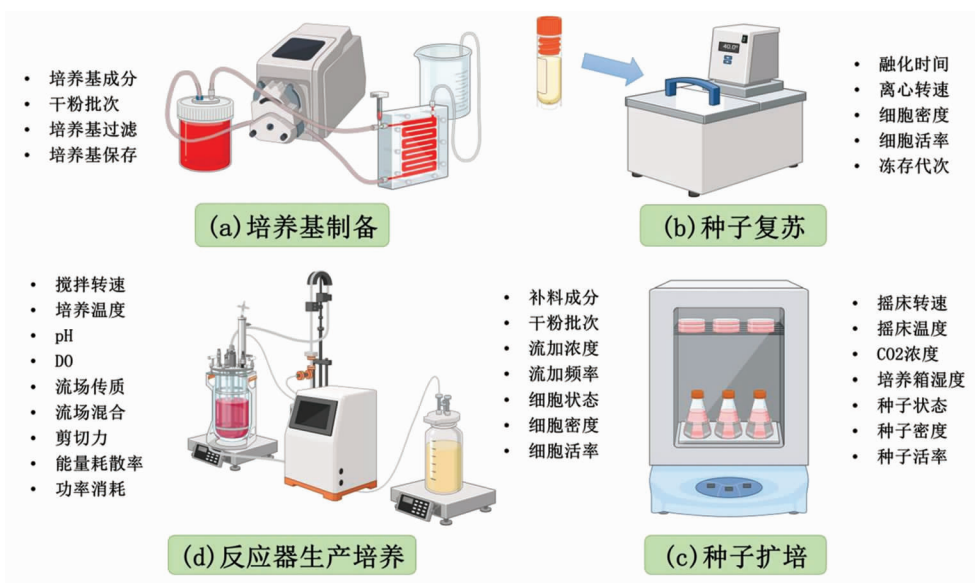


图3 细胞培养过程中的工艺参数

Fig.3 Process parameters of cell culture



### 3.3 生物过程的理性放大

根据化工放大经验,反应器设备成本与体积的 0.6 次方成正比,产量与体积成正比,体积放大 100 倍,单位产量设备成本降低 15.8%<sup>[121]</sup>。目前,现有动物细胞培养常用反应器体积为 1~3 m<sup>3</sup>,远低于微生物发酵的规模,若进行细胞培养肉工业化生产,则生物反应器体积及培养密度需提高一个数量级。生物反应器的扩大过程并不仅仅是一个简单的几何问题,而是一个涉及物理、化学因素以及生物动力学变化的复杂过程,这使得对其进行精确的动态模拟难度较大。

生物过程放大的关键是保持各种规模反应器中细胞生理状态的一致性。传统的生物过程放大方法依赖经验,保持不同规模反应器的几何学、流体力学、浓度和生物化学等相关变量的特性相似。常用放大准则包括:①几何相似准则,根据液位与反应器直径等几何参数进行放大;②氧气体积传质系数(kLa)相似准则,确保大型反应器的溶氧转移能力与细胞需求匹配;③叶端速度相似准则,保持搅拌桨对细胞的机械损伤和罐体内流场的均一性;④单位体积能量输入(P/V)相似准则,考虑搅拌和深层通气的能量输入对混合效果和流体分布的影响。然而,实践证明,细胞培养的放大过程中只能维持部分参数不变,这会导致规模化生产的培养条件与实验室规模有差异。这种差异会影响反应器内环境的均匀性,使反应器内出现空间上的梯度分布,从而影响细胞的生理代谢过程以及细胞的产率和质量<sup>[122]</sup>。

目前,可以利用 Scale-down 方法,通过对实验室规模反应器的设计或改进来模拟大规模反应器的环境梯度<sup>[123]</sup>。其流程基本是:首先,对大型反应器内的各项工程参数(如混合、传质、传热)进行时间常数分析,并与生物过程(如底物消耗、生长等)的时间常数进行比较,以识别出导致放大效应的限制性因素。然后,在小型反应器中模拟这一限制性因素,研究非均匀环境对细胞代谢的影响,并进行过程优化。最后,在大型反应器中复现优化结果,实现在具有相似限制因素的情况下的放大。此外,计算流体力学(CFD)已在生物反应器理性放大中得到广泛应用<sup>[124]</sup>。CFD 的优势在于可以通过数学建模和计算机数值求解,定量描述反应器的

流场特性。通过 CFD 模拟,不仅可以获取反应器内部流场的相关参数,以此为依据进行反应器结构的优化,还可以将 CFD 与生物过程的动力学模型相结合,建立耦合模型对生物过程进行更加准确的放大模拟和预测。

## 4 动物细胞培养肉食用品质提升的生物学过程

### 4.1 肌纤维、脂肪细胞的高效生成及成熟

肌纤维和脂肪是肉制品的重要组成部分,也是细胞培养肉的生产目标。不同的肌纤维类型和成熟度以及肌红蛋白含量的差异,都会对肉类的营养品质和口感产生影响。此外,肌间脂肪可以降低肌纤维间的密度,适当的脂肪含量可以维持肌肉的保水性,嫩滑的口感和多汁性。因此,需要综合考虑肌纤维的类型和成熟度,肌红蛋白含量以及脂肪的含量和脂肪酸类型,才能制备出高品质的细胞培养肉产品。

#### 4.1.1 肌纤维成熟度和类型对肉类品质的影响

随着分化进程的推进,肌纤维细胞会产生大量的肌肉特异性蛋白,如肌动蛋白和肌球蛋白。此外,肌纤维细胞也会逐渐积累更多的细胞外基质(ECM)蛋白,如胶原蛋白和纤维连接蛋白,最终使得肌肉组织的成熟度越来越高,优质蛋白含量越来越高,肉质品质也得到改善。研究表明,随着肌纤维的不断成熟,肌球蛋白(Myosin)、肌增生素 Myozenin(Myoz1 和 Myoz3)、肌钙蛋白 I(Tnni2)和肌营养不良蛋白(Dmd)的表达逐渐增加,因此这些标记物是评估肌纤维成熟度的优秀指标<sup>[125]</sup>。此外,肌肉品质不仅与蛋白含量高、低有关,还与肌纤维类型有关。肌纤维通常分为白肌纤维(快肌纤维)、红肌纤维(慢肌纤维)和中间肌纤维 3 种。肌红蛋白是肌肉细胞中一种负责传递和贮存氧的蛋白质,其含量会影响肉质颜色和肌纤维类型组成,导致肉的品质差异。例如,红肌纤维含有较多的肌红蛋白,因此颜色呈红色<sup>[126]</sup>;白肌纤维的肌红蛋白含量较少,因此颜色呈白色;中间肌纤维在肌红蛋白含量、色泽方面介于红肌纤维和白肌纤维之间。快肌纤维的直径大于慢肌纤维,因此快肌纤维比重较大,通常具有更坚硬、紧实的口感,相反,慢肌纤维的肌肉通常更嫩,更细腻<sup>[127]</sup>。因此,提高

肌纤维成熟度和增加慢肌纤维比例,是提高肉质营养品质和细腻口感的重要举措。

#### 4.1.2 脂肪酸的构成和含量对肉类品质的影响

脂肪是风味物质形成的前体,其通过水解、热分解、氧化及美拉德等反应产生醛类、酮类及醇类等物质,形成肉类的特征风味,并且脂肪氧化产生的碳酰化合物种类及数量的不同,是不同肉品具有各自特征风味的最主要原因<sup>[128]</sup>。此外,一定含量的肌内脂肪可以使肉类呈现出大理石花纹并获得较好的保水性,使肉制品具有多汁性和嫩滑的口感<sup>[129]</sup>。在成熟脂肪细胞中,脂滴的体积可以占到细胞体积的90%以上,脂滴以半液体状态被储存起来,主要成分是甘油三酯和胆固醇酯。甘油三酯由甘油和脂肪酸组成,其中脂肪酸包括饱和脂肪酸、单不饱和脂肪酸和多不饱和脂肪酸。除了激素类药物,如胰岛素、糖皮质激素和三碘甲状腺原氨酸等可以有效诱导前脂肪细胞中脂肪的生成<sup>[130]</sup>,还有一些天然产物,如维生素C<sup>[131]</sup>、人参皂苷Rb1<sup>[132]</sup>促进前体脂肪细胞成脂分化。直接向培养基中添加不饱和脂肪酸,如亚麻酸和花生四烯酸,可以增加脂肪细胞内不饱和脂肪酸的含量。此外,提高脂肪酸去饱和酶(FADS)和硬脂酰-CoA去饱和酶(SCD)的表达和活性,可以促进不饱和脂肪酸的合成<sup>[133]</sup>。需要说明的是,脂肪含量过高会影响消费者机体消化不良,造成消化负担以及肥胖,因此在细胞培养肉制备过程中需要适当控制脂肪的含量,生产健康脂肪。我国营养学会建议膳食脂肪中饱和、单不饱和、多不饱和脂肪酸的比例应为1:1:1。此外,增加不饱和脂肪酸,如 $\omega$ -6和 $\omega$ -3的摄入可降低心血管疾病的发病率,这些都为细胞培养肉研究提供了思路。

#### 4.2 风味物质的解析和强化

为了成为真实肉类的有效替代品,细胞培养肉必须在营养成分与感官属性上与传统肉类产品相似。在真实的肉类结构中,除了含有肌纤维和脂肪外,还含有结缔组织以及血液成分,这些不同的组分共同赋予肉制品特有的质构、风味、色泽以及丰富的营养成分。因此,需要解析肉制品的关键风味物质,以进一步提升细胞培养肉的风味和品质。

针对细胞培养肉的风味解析和强化,可以从可溶性糖、游离氨基酸、游离脂肪酸以及挥发性风

味物质几方面入手。可溶性糖不仅能够直接影响肉制品的甜味,而且还原糖与游离氨基酸能够在烹饪过程中发生美拉德反应,使肉类产品形成复杂的风味化合物<sup>[134]</sup>。可溶性糖的检测通常采用高效液相色谱检测法(High performance liquid chromatography, HPLC),这种方法适用于同时分析和定量主要糖类,包括果糖、葡萄糖和蔗糖<sup>[135]</sup>。游离氨基酸在赋予肉类风味方面起着至关重要的作用。有研究报道组氨酸、精氨酸、蛋氨酸、缬氨酸、色氨酸、酪氨酸、异亮氨酸、亮氨酸和苯丙氨酸呈苦味;丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、甘氨酸、赖氨酸、脯氨酸和羟脯氨酸呈甜味;谷氨酸钠和天冬氨酸钠负责提供咸味,而天冬氨酸、谷氨酸、组氨酸和天冬酰胺则提供酸味<sup>[136-137]</sup>。游离脂肪酸对改善肉类风味起重要作用,在肉类食品加工的过程中它们被进一步氧化形成挥发性风味化合物,包括醛、醇、酮和烃类,对肉类产品的风味有显著影响<sup>[138]</sup>。肉类产品中的游离氨基酸和游离脂肪酸可以分别使用高效液相色谱与气相色谱-质谱联用(Gas chromatography-mass spectrography, GC-MS)检测<sup>[139-140]</sup>。目前的细胞培养肉研究领域,针对这些风味物质的检测和分析相对欠缺,需要逐一分析并针对性强化。

#### 4.3 整块组织的规模化制备

4.3.1 细胞支架材料 选择可食用的支架材料是制备细胞培养肉,特别是有一定厚度的培养肉产品的关键一环。理想的支架材料应具备多孔结构、良好的细胞相容性、可降解或可食用,同时还应提供与目标肉制品相似的质构特性<sup>[141]</sup>。这些材料既可以来源于天然,如从动、植物中提取的蛋白质和多糖,也可以是经过精密设计的合成聚合物。支架的结构和性能不仅受材料本身特性的影响,还取决于使用的交联方法(如化学交联、物理交联或酶促交联等)。针对细胞培养肉应用场景,应从细胞适配性、支架结构稳定性、功能性以及食品安全性等方面综合评估,选择合适的支架材料和交联方法,并优化支架构建流程,为细胞培养肉提供坚实可靠的结构基础<sup>[142-145]</sup>。

天然支架材料主要源自动植物组织,如动物的皮肤、骨骼、软骨以及某些植物的纤维和蛋白质,具有可食用性以及良好的细胞黏附性和可降

解性。目前广泛应用的天然支架材料包括胶原蛋白,明胶、丝素蛋白和植物分离蛋白等蛋白质材料,以及海藻酸盐、壳聚糖、纤维素、琼脂糖、黄原胶和结冷胶等多糖材料<sup>[146-149]</sup>。除天然支架材料外,合成聚合物支架材料因稳定性和可控性而在食品领域备受青睐。例如,Zhou 等<sup>[150]</sup>使用豌豆淀粉和聚乳酸合成了可降解的食品薄膜,聚乙烯吡咯烷酮等已被批准作为食品和饮料中的添加剂,这些新型材料为细胞支架构建提供了新的视角。

**4.3.2 三维塑形方法** 三维塑形是细胞培养肉制备的最重要的环节之一,旨在模拟天然的肌肉或脂肪组织结构,维持肌肉细胞或脂肪细胞的三维生长、成熟和功能表达,从而获得具有一定纹理、质构特性和营养特性的细胞培养肉产品。目前,三维塑形方法可分为 4 类,包括固体支架法、3D 生物打印技术、静电纺丝技术和片层堆叠法等(图4)。

固体支架首先利用脱细胞组织、水凝胶、植物蛋白等材料制备出预成型细胞支架,再将细胞接种于支架中进行三维培养,从而形成肌纤维和脂肪等组织。固体支架制作方法多样且相对简单,具有大规模细胞培养肉生产的潜力。近日,Jones 等<sup>[151]</sup>将脱细胞支架应用于制作细胞培养肉,成功在菠菜脱细胞支架上培养牛卫星细胞,细胞存活

率高达 97.4%。3D 生物打印技术在制造复杂组织结构方面具有独特优势,其可以精准控制打印参数,如温度、样品形状、孔隙形状等,并灵活分配细胞和非细胞成分的比例。例如,Xu 等<sup>[152]</sup>将大黄鱼肌肉纤维和脂肪细胞与水凝胶混合后进行 3D 生物打印和细胞三维培养,成功制备出细胞培养鱼排。静电纺丝技术是利用静电作用力将明胶等高聚物溶液以一定流速挤出注射器针头形成微米级超细纤维,将该纤维细丝作为培养细胞的支架。MacQueen 等<sup>[153]</sup>开发的浸没式旋转喷气纺丝技术,可用于生产微纤维明胶支架并应用于肌肉组织工程。Zhang 等<sup>[148]</sup>利用静电纺丝技术处理小麦谷蛋白(WG),成功生产出细微的 WG 纳米纤维。这些可食用纤维在物理和化学特性上与天然肌肉组织相似,在食品工程中具有广阔应用前景。片层堆叠法是将细胞接种于紧密排列的微载体上,并将细胞片层通过多层堆叠的方式来构建块状的培养肉。Park 等<sup>[147]</sup>使用明胶微球作为一种三维空隙材料,通过细胞自组装形成细胞片,将多重细胞片叠加形成质地厚实的培养肉产品。Yen 等<sup>[142]</sup>在可食用的壳聚糖-胶原蛋白微载体上扩增牛骨髓间充质干细胞(bMSCs),生成细胞化的微组织,与脂肪替代物交联制成分层培养肉。

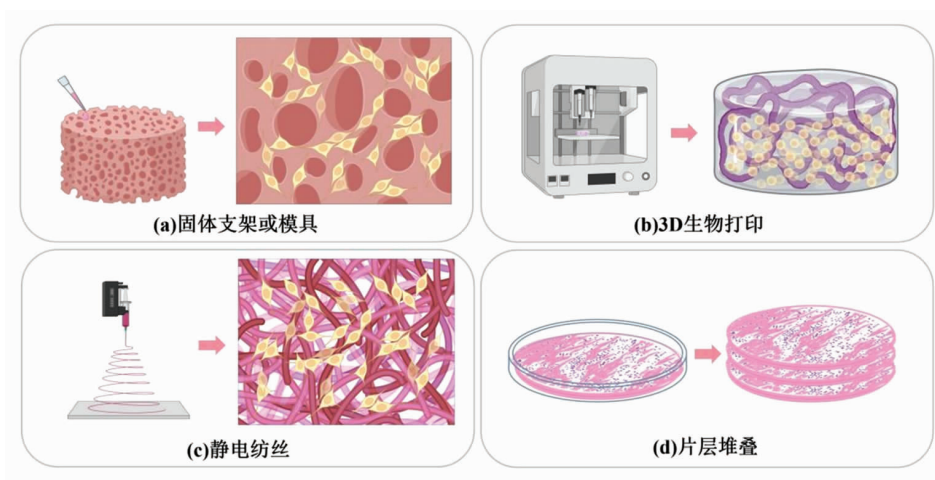


图 4 三维塑形方法示意图

Fig.4 Schematic diagram of three-dimensional molding methods

## 5 细胞培养肉工程化面临的技术挑战

### 5.1 高性能种子细胞系的构建

种子细胞是合成细胞培养肉的最核心原料,

虽然采用常规的酶消化法或组织培养法能够从畜禽动物胚胎或成体组织中提取出干细胞或其它具有增殖能力的细胞,大多数细胞也可在体外进行

传代培养,但是,通常情况下原代动物细胞在体外培养 20~30 d 后就会出现生长缓慢、停滞的现象,随后大部分细胞衰老死亡<sup>[154]</sup>。因此,虽然目前在实验室水平能够利用牛、猪、鸡、鸭、鱼等多个物种的细胞实现细胞培养肉的生物合成,但是有限的细胞增殖能力和功能维持效力使细胞培养肉的工程化生产面临巨大挑战。

细胞培养肉的工程化生产依赖的动物细胞规模化培养,其先决条件是构建高性能的种子细胞系或细胞株。虽然目前行业内对高性能种子细胞系(株)没有明确的定义,但是总体上需满足以下要求:①细胞能够在体外快速、长期增殖,至少能够传代 20 次,扩增  $10^8$  倍;②细胞可在千升及以上级生物反应器中大规模培养,培养过程中细胞基因组稳定并保持良好的活力和功能;③扩增后仍能被诱导生成肌纤维、脂肪、基质蛋白等肌肉组织中的成熟细胞或组分<sup>[155]</sup>。在细胞工程领域,主要采用连续传代培养或基因改造策略进行细胞系的构建,然后,从细胞系中用单细胞分离培养或筛选的方法获得由单细胞克隆形成的细胞株。由于基因改造策略在食品领域存在法规和接受度的问题,因此通过连续培养使细胞“自发”获得永生化或其它预期表型,是细胞培养肉领域主流的细胞系构建方式,然而,细胞自发永生化的概率极低(约  $10^{-7}$ ),不确定性大。另外需要说明的是,虽然获得“永生细胞系”是大规模细胞培养的理想选择,但是建系后需对细胞的染色体异倍化、恶性化、致敏性等进行严格检测,以确保永生细胞无恶性细胞的特征。例如,大多数恶性细胞会失去细胞接触抑制,细胞贴壁能力降低,细胞动力学发生改变,并具有成瘤性等。因此,可进行核型分析、体外软琼脂集落试验以及体内成瘤试验,确保用于细胞培养肉生产的种子细胞的安全性。

## 5.2 高品质成熟细胞的诱导生成

动物肌肉、脂肪、结缔组织等是生产肉制品的主要部位,其中的最小结构单元分别是肌肉细胞(又称肌纤维)、脂肪细胞和成纤维细胞。细胞培养肉技术的底层逻辑就是将动物的组织生成过程由体内变革为体外进行,其生产目标与传统动物肉一致。因此,种子细胞在大规模增殖后,需诱导分化使其退出细胞周期,表达肉类谱系特异性基因,

生成肌纤维、脂肪等成熟的功能细胞并合成三维组织<sup>[12]</sup>。然而,由于体内外环境差异,种子细胞系本身分化能力不足,诱导方法不合适等原因,在体外获得高成熟度的肌肉、脂肪细胞的难度非常大,这是导致细胞培养肉风味和营养品质不足的重要原因。

机体的生长发育、组织形成以及损伤修复等过程在胞内外多维信息的精准调控下有序进行。然而,在动物细胞发育、属性演变和功能塑造过程中胞外微环境组分变化和胞内基因调控网络方面仍存在大量的研究空白,细胞成肌、成脂分化和成熟的关键调控因子尚未被全面揭示,因此无法在体外对细胞生长和发育进行精准调控。此外,培养肉组织的高效制造离不开可食用、良好的细胞相容性和力学性能的细胞支架和合适的成型方法<sup>[144]</sup>。虽然医学组织工程领域已研发出多种水凝胶、三维多孔或纤维类型的支架材料,但是大多数材料不可食用或存在动物源成分,不适用于制备培养肉组织。来源广泛、价格低廉的植物或微生物蛋白、多糖类物质在细胞培养肉领域具有较大的研究和应用潜力,然而,这类材料是否可以有效支持细胞附着和增殖需要深入探讨。此外,由于肌纤维定向生长的特性,因此可通过机械拉伸、电刺激或引入细胞排列路径等方法促进细胞的定向排布并强化肌纤维的生成效率。总体而言,生物、材料与食品科学和技术的交叉融合,是生成高品质细胞培养肉的基石。

## 5.3 低成本无血清培养基的开发

自细胞培养肉技术创制以来,高昂的生产成本就是制约其产业化发展的关键卡点问题。从最初造价 33 万美元的全球第一款细胞培养牛肉汉堡,到最近多家企业宣布将细胞培养肉生产成本降至每公斤百美元级,虽然 10 年来细胞培养肉的生产成本已下降了数十万倍,但是即便如此,仍远远高于目前市场上肉制品的售价<sup>[22,156]</sup>。由于细胞的体外培养需使用大量的细胞培养基,其成本占细胞培养肉生产总成本的 60% 以上,因此,开发低成本、无血清等动物源成分的培养基,是细胞培养肉技术走向工业化的必要前提。

目前,针对生物医药领域的常用细胞系,如 CHO 细胞、293 细胞等已成功研发出无动物源成

分培养基,用于合成细胞培养肉种子细胞系均为自主构建,然而市场上并没有完全适用的无血清培养基,需进行针对性开发。培养基的开发策略可以分为自上而下和自下而上两种,其中自下而上的策略是指对培养基中各个成分的不同浓度进行细胞生长和功能影响评估,而自上而下的策略先将培养基成分进行分类,针对每个类别进行化合物筛选和组合优化。细胞培养基包含40~60种组分,因此无论哪种策略,都需要耗费大量的时间进行大量的试验,才能确定最佳的配方和使用浓度<sup>[157]</sup>。在某些情况下,无血清培养基能够在短期(5~7 d)支持细胞分裂增殖,然而维持细胞长期生长的效果不佳,需进行连续传代试验以确认该培养基配方对细胞长期分裂增殖和功能维持的效力。此外,在确定无血清培养基配方后,需进行成本核算。通常无血清培养基中的功能添加剂(细胞因子、激素等)和载体蛋白(转铁蛋白、白蛋白等)价格十分高昂,仍需寻找这些组分的低成本替代物或开发低成本生产策略。虽然基于微生物发酵法能够实现多种细胞因子或蛋白的重组表达,但是某些物质由于序列和结构的特殊性,难以进行高效的重组表达,或者重组表达的蛋白存在无活性或活性低的问题,因此仍需进行大量深度研究才能开发出满足细胞培养肉规模和成本要求的无血清培养基。

#### 5.4 超大规模培养体系的建立

开发和建设规模化生产体系,是细胞培养肉实现商业化生产和产品上市销售的根本保障。生物反应器是动物细胞大规模培养的基本装置,它的体积可以达到万升乃至百万升,并且可以进行温度、溶氧、pH值等条件的精确控制,近年来已广泛应用于生物医药领域中蛋白质药物、单克隆抗体、疫苗的生产<sup>[158]</sup>。然而,细胞培养肉领域的种子细胞并非广泛使用的工程化细胞,没有成熟的大规模培养工艺和参数,因此需要针对性设计大规模生物反应器,研究控制参数和放大工艺。

生物反应器种类繁多,需要综合考虑培养细胞的生长特性、生产规模、目标产品特点、成本等多方面的因素来选择合适的反应器类型。目前技术较为成熟且能够满足千升级以上培养规模的是搅拌釜反应器。由于生产细胞培养肉种子细胞

通常是贴壁生长,因此需要建立基于微载体的悬浮培养工艺<sup>[159]</sup>。由于动物细胞对剪切应力十分敏感,通常使用的搅拌转速很低,一般是使载体完全悬浮的最低转速,此时气-液传质或液相混合并未达到最佳状态,因此目前基于微载体的细胞培养规模难以突破千升级规模,这是阻碍细胞培养肉超大规模培养体系建立的重要因素之一。此外,在进行高密度、大规模细胞培养时,除需要及时补充营养物质、快速排泄代谢废物外,还需要有效的气体供应。例如,随着反应器体积增加,混合时间明显增加,反应器内溶氧水平呈现梯度化分布<sup>[160]</sup>。此时,反应器内只有部分区域能满足细胞正常培养条件,如不优化,大型反应器只能达到实验室产率的一半或更低。在完成细胞大规模扩增后,需要进行细胞的诱导分化,形成肌纤维、脂肪等成熟细胞,同时结合三维培养合成完整的肌肉组织。理论上,可以使用三维结构支架结合灌注式反应器进行肌肉组织的三维培养,然而,这种培养模式能够达到多大的生产规模仍未知,其中涉及灌注压力、流场分布、细胞耐受和功能影响等多方面的因素有待深入研究。最后,细胞培养肉规模化制造还需要对多个生产环节的装备和工艺进行整合贯通,进而建立端到端的连续制造生产体系。

## 6 细胞培养肉领域未来技术攻关方向

针对细胞培养肉工业化的技术挑战,未来应围绕以下4个方向进行深入研究和重点攻关,以促进细胞培养肉技术发展并推动其工业化进程。

1) 创制培养肉种子细胞资源库 种子细胞的种属、类型、特性和功能对于细胞培养肉生产工艺的建立和终产品的价值和品质至关重要。创制品系优良、种类丰富的动物细胞资源库,有利于细胞培养肉技术的研发和产业化应用。首先,可以围绕居民日常消费的畜禽水产类物种,挖掘具有优良肉质和营养品质的动物品系和地方良种资源,研发培养肉种子细胞的高效分离提取方法。同时,可以将研究范围扩展到难以人工养殖的特种畜禽、野生水产动物,如梅花鹿、金枪鱼、鳕鱼、娃娃鱼等。获得动物原代细胞后,可针对性优化细胞的体外培养方法,探究细胞长期稳定增殖技术,从而获得种子细胞系并构建细胞资源库。还可以建立

信息化系统,对细胞的来源、检测、运输、存储、放行等全周期进行监测。

2) 深化生长发育调控基础研究 细胞培养肉产品若要取得消费者的青睐必须在口感、风味和营养方面达到甚至超越传统肉类产品,只有全面、深入厘清细胞生长发育、功能调控、肌肉和脂肪等组织生成的过程和机理,才能实现细胞在体外的高效增殖、分化和成熟,进而生产出高品质的细胞培养肉产品。首先,明确动物干细胞鉴别、分选和功能维持的关键分子和作用机制,建立细胞快速增殖和功能维持方法。之后,研究动物肌纤维、脂肪等细胞和组织的生成过程和细胞定向发育机制,建立体外高效诱导成肌、成脂分化技术。最后,探究组织中多细胞精细互作模式,解析细胞网络形成和规律性分布的调控机制,实现培养肉组织的高效合成。

3) 低成本培养基的智能化开发 低成本培养基的开发,是细胞培养肉技术领域永恒的话题。虽然用于生产细胞培养肉的培养基不需要完全遵循制药领域的严格标准和原料等级,但是对于培养基成本控制的要求非常高,短期内很难突破。初步估计,如果将用于培养肉生产的培养基成本降至5元/L以下,将使细胞培养肉商业化产品的价格达到可接受区间。目前,主要采用化合物高通量筛选和统计学试验等方法进行培养基开发,整体试验周期长且工作量大,需进一步研发更加高效、精准的智能培养基开发策略。利用组学技术、高内涵成像仪器、人工智能网络等先进技术,可以解析种子细胞的营养偏好和代谢特点,并构建和优化细胞关键成分的代谢模型,将有助于提高培养基开发的效率。然后,利用合成生物学技术可以实现培养基昂贵组分的低成本生产,最终构建一套培养肉生产用培养基的高效开发和生产体系。

4) 细胞培养肉的营养安全评估 细胞培养肉技术迅速发展,然而有关细胞培养肉产品的潜在食品安全危害、产品消化吸收特性、膳食暴露方面的研究仍严重不足。阐明细胞培养肉的食用安全性和营养学特点,对推进产业发展和打消消费者疑虑具有重要作用。建议按照细胞培养肉的主要环节开展安全风险评估和关键控制点体系研究,重点开展生产中培养基等外源物质安全性、细

胞遗传稳定性和病原微生物污染的评估,进而提出基于风险的预防性控制措施。同时,进行全面详细的细胞培养肉膳食暴露和营养学相关研究,建立评估模型,明确通过细胞培养生产新型食品蛋白的营养品质与传统动物蛋白的异同,总结细胞培养肉的营养学意义。此外,重视细胞连续培养过程、食品化加工和熟化过程中新过敏原的产生和变化规律,建立过敏原风险评估与阻控技术,保障细胞培养肉的安全和营养。

### 参 考 文 献

- [1] POST M J, LEVENBERG S, KAPLAN D L, et al. Scientific, sustainability and regulatory challenges of cultured meat[J]. *Nature Food*, 2020, 1(7): 403-415.
- [2] GUAN X, ZHOU J W, DU G C, et al. Bioprocessing technology of muscle stem cells: Implications for cultured meat[J]. *Trends in Biotechnology*, 2022, 40(6): 721-734.
- [3] ZHANG G Q, ZHAO X R, LI X L, et al. Challenges and possibilities for bio-manufacturing cultured meat[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2020, 97: 443-450.
- [4] GUAN X, LEI Q Z, YAN Q Y, et al. Trends and ideas in technology, regulation and public acceptance of cultured meat[J]. *Future Foods*, 2021, 3: 100032.
- [5] STEPHENS N, DI SILVIO L, DUNSFORD I, et al. Bringing cultured meat to market: Technical, socio-political, and regulatory challenges in cellular agriculture[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2018, 78: 155-166.
- [6] LI M, WANG D D, FANG J H, et al. An efficient and economical way to obtain porcine muscle stem cells for cultured meat production[J]. *Food Research International*, 2022, 162(Part B): 112206.
- [7] 李丹奔, 徐涵, 赵晓雨, 等. 细胞培养肉的发展现状和挑战[J]. *农业生物技术学报*, 2023, 31(1): 165-171.  
LI D Y, XU H, ZHAO X Y, et al. Recent developments and future challenges of cultured meat[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2023, 31(1): 165-171.

- [8] ZHU G X, GAO D F, LI L Z, et al. Generation of three-dimensional meat-like tissue from stable pig epiblast stem cells[J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 8163.
- [9] LEE B R, YANG H. *In vitro* culture of chicken embryonic stem cell-like cells[J]. *Journal of Animal Reproduction and Biotechnology*, 2014, 38(1): 26–31.
- [10] NIE M M, WU Z H, YOU F. Derivation and characterization of a new embryonic cell line from the olive flounder *paralichthys olivaceus*[J]. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2021, 21(4): 159–167.
- [11] XU W Q, GAO L N, LI W, et al. The adaptation of bovine embryonic stem cells to the changes of feeder layers[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 2023, 59(2): 85–99.
- [12] SOTO D A, NAVARRO M, ZHENG C, et al. Simplification of culture conditions and feeder-free expansion of bovine embryonic stem cells[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 11045.
- [13] HO S Y, GOH C W P, GAN J Y, et al. Derivation and long-term culture of an embryonic stem cell-like line from zebrafish blastomeres under feeder-free condition[J]. *Zebrafish*, 2014, 11(5): 407–420.
- [14] FANG J H, LI M, ZHANG G Q, et al. Vitamin C enhances the proliferation of porcine muscle stem cells for cultured meat production[J]. *Food Function*, 2022, 13(9): 5089–5101.
- [15] LEE J M, LEE H, LEE S T. Development of an effective dissociation protocol for isolating mesenchymal stem cells from bovine intermuscular adipose tissues[J]. *Journal of Animal Reproduction and Biotechnology*, 2014, 38(1): 10–16.
- [16] 刘裴裴, 丁世杰, 宋文娟, 等. NAC通过调控活性氧影响脂肪间充质干细胞增殖和分化[J]. *中国农业科学*, 2023, 56(21): 4330–4343.
- LIU P P, DING S J, SONG W J, et al. NAC affects proliferation and differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells by regulating reactive oxygen species[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2023, 56(21): 4330–4343.
- [17] 吴雅廷, 刘海亮. 柚皮素对脂肪间充质干细胞增殖的影响[J]. *同济大学学报(医学版)*, 2021, 42(1): 3–10.
- WU Y T, LIU H L. Effect of naringenin on proliferation of adipose-derived stem cell[J]. *Journal of Tongji University (Medical Science)*, 2021, 42(1): 3–10.
- [18] WOLBANK S, STADLER G, PETERBAUER A, et al. Telomerase immortalized human amnion- and adipose-derived mesenchymal stem cells: Maintenance of differentiation and immunomodulatory characteristics[J]. *Tissue Engineering Part A*, 2009, 15(7): 1843–1854.
- [19] YASUMURA Y, TESHIMA T, NAGASHIMA T, et al. Immortalized canine adipose-derived mesenchymal stem cells as a novel candidate cell source for mesenchymal stem cell therapy[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(3): 2250.
- [20] PLIKUS M V, WANG X, SINHA S, et al. Fibroblasts origins, definitions, and functions in health and disease[J]. *Cell*, 2021, 184(15): 3852–3872.
- [21] ARCHILE-CONTRERAS A C, PURSLOW P P. Oxidative stress may affect meat quality by interfering with collagen turnover by muscle fibroblasts[J]. *Food Research International*, 2011, 44(2): 582–588.
- [22] 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[J]. *Nature Food*, 2023, 4(1): 35–50.
- [23] HERNÁNDEZ -HERNÁNDEZ J M, GARCÍA -GONZÁLEZ E G, BRUN C E, et al. The myogenic regulatory factors, determinants of muscle development, cell identity and regeneration[J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2017, 72: 10–18.
- [24] CHEN S L, WU C C, LI N, et al. Post-transcriptional regulation of myogenic transcription factors during muscle development and pathogenesis [J]. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 2024, 45(1): 21–39.
- [25] KIM W S, KIM J. Exploring the impact of temporal heat stress on skeletal muscle hypertrophy in bovine myocytes [J]. *Journal of Thermal Biology*, 2023, 117: 103684.
- [26] GUAN X, YAN Q Y, WANG D D, et al. IGF-1 signaling regulates mitochondrial remodeling during myogenic differentiation[J]. *Nutrients*, 2022, 14(6): 1249.
- [27] GUAN X, PAN Z H, XU Z Y, et al. Natural

- flavonoid luteolin promotes the differentiation of porcine myoblasts through activation of PI3K/Akt/mTOR signaling [J]. *Food Bioscience*, 2022, 47: 101766.
- [28] YAN Q Y, FEI Z C, LI M, et al. Naringenin promotes myotube formation and maturation for cultured meat production[J]. *Foods*, 2022, 11(23): 3755.
- [29] WANG Y F, ZHONG Z H, WANG R Q, et al. Effects of proanthocyanidins and dialdehyde chitosan on the proliferation and differentiation of bovine myoblast for cultured meat production[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 246: 125618.
- [30] TONTONOZ P, HU E, SPIEGELMAN B M. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor [J]. *Cell*, 1994, 79(7): 1147-1156.
- [31] ROSEN E D, HSU C H, WANG X, et al. C/EBP $\alpha$  induces adipogenesis through PPAR $\gamma$ : A unified pathway[J]. *Genes & Development*, 2002, 16(1): 22-26.
- [32] 伍志伟, 刘丹, 刘永琦, 等. 黄芪多糖对低氧环境中 BMSCs 成脂分化的影响[J]. *生物工程学报*, 2017, 33(11): 1850-1858.
- WU Z W, LIU D, LIU Y Q, et al. Effects of *Astragalus* polysaccharides on adipogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in low oxygen environment[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2017, 33(11): 1850-1858.
- [33] DANIELLE G, RAYMOND N, MICHEL L, et al. Requirement and role of arachidonic acid in the differentiation of pre-adipose cells [J]. *Biochem J*, 1989, 257(2): 389-397.
- [34] MOSTOLI R, GOUDARZI F, MOHAMMADALIPOUR A, et al. Evaluating the effect of arachidonic acid and eicosapentaenoic acid on induction of adipogenesis in human adipose-derived stem cells[J]. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 2020, 23(8): 1028-1034.
- [35] 梁媛, 赵馨怡, 张靖伟, 等. 亚油酸和  $\alpha$ -亚麻酸对脂肪干细胞活力及成脂分化的影响[J]. *大连工业大学学报*, 2017, 36(5): 323-327.
- LIANG Y, ZHAO X Y, ZHANG J W, et al. Effect of linoleic acid and alpha-linolenic acid on cell viability and adipogenic differentiation in adipose tissue-derived stromal cells [J]. *Journal of Dalian Polytechnic University*, 2017, 36(5): 323-327.
- [36] WU R F, LIU Y H, YAO Y X, et al. FTO regulates adipogenesis by controlling cell cycle progression via m(6)A-YTHDF2 dependent mechanism[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2018, 1863(10): 1323-1330.
- [37] 王新苗, 李杰, 曹璐畅, 等. 细胞衰老与肿瘤相关研究进展[J]. *现代肿瘤医学*, 2024, 32(3): 548-552.
- WANG X M, LI J, CAO L C, et al. Research progress of the relationship between senescence and tumor[J]. *Modern Oncology*, 2024, 32(3): 548-552.
- [38] BERNADOTTE A, MIKHELSON V M, SPIVAK I M. Markers of cellular senescence. Telomere shortening as a marker of cellular senescence[J]. *Aging*, 2016, 8(1): 3-11.
- [39] RAFFAELLA F. Oxidative stress and cell senescence process[J]. *Antioxidants*, 2022, 11(9): 1718-1718.
- [40] 侯碧巍, 董书餐, 刘德武, 等. 不同动物原代细胞的永生方法及其应用[J]. *中国兽医杂志*, 2023, 59(8): 97-103.
- HOU B W, DONG S C, LIU D W, et al. immortalization methods of primary cells from different animals and their applications[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2023, 59(8): 97-103.
- [41] STOUT A J, ARNETT M J, CHAI K, et al. immortalized bovine satellite cells for cultured meat applications [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2023, 12(5): 1567-1573.
- [42] CHENG Y M, HONG P C, SONG M M, et al. An immortal porcine preadipocyte cell strain for efficient production of cell-cultured fat [J]. *Communications Biology*, 2023, 6(1): 1202.
- [43] LORENZ J. Embryonic development *in vitro*: What do cytokines bring in the culture medium? [J]. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*, 2020, 80(2): 113-114.
- [44] QUINTANS J S S, SHANMUGAM S, HEIMFARTH L, et al. Monoterpenes modulating cytokines - A review [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2019, 123: 233-257.
- [45] STENKEN J A, POSCHENRIEDER A J. Bioanalytical chemistry of cytokines - A review[J]. *Anal Chim Acta*, 2015, 853: 95-115.
- [46] QAZI T H, MOONEY D J, DUDA G N, et al. Biomaterials that promote cell-cell interactions en-



- hance the paracrine function of MSCs[J]. *Biomaterials*, 2017, 140: 103–114.
- [47] BUCKELS A, ZHANG Y, JIANG J, et al. Autocrine/paracrine actions of growth hormone in human melanoma cell lines[J]. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 2019, 21: 1007–1016.
- [48] KARIMI-ABDOLREZAEI S, EFTEKHARPOUR E, WANG J, et al. Synergistic effects of transplanted adult neural stem/progenitor cells, chondroitinase, and growth factors promote functional repair and plasticity of the chronically injured spinal cord[J]. *Journal of Neuroscience the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 2010, 30(5): 1657.
- [49] AUDET J. Adventures in time and space: Nonlinearity and complexity of cytokine effects on stem cell fate decisions[J]. *Biotechnology & Bioengineering*, 2010, 106(2): 173–182.
- [50] ZHANG C C, LODISH H F. Cytokines regulating hematopoietic stem cell function[J]. *Current Opinion in Hematology*, 2008, 15(4): 307–311.
- [51] HOLDER P G, LIM S A, HUANG C S, et al. Engineering interferons and interleukins for cancer immunotherapy[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2022, 182: 114112.
- [52] HAMILTON J A. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2008, 8(7): 533–544.
- [53] XIE Y L, SU N, YANG J, et al. FGF/FGFR signaling in health and disease[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2020, 5(1): 181.
- [54] LEROITH D, HOLLY J M P, FORBES B E. The insulin-like growth factors: Ligands, binding proteins, and receptors[J]. *Molecular Metabolism*, 2021, 52: 101245.
- [55] PROPPER D J, BALKWILL F R. Harnessing cytokines and chemokines for cancer therapy[J]. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2022, 19(4): 237–253.
- [56] LEONARD W J, LIN J X. Strategies to therapeutically modulate cytokine action[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2023, 22(10): 827–854.
- [57] LEI Q Z, LI M, DU G C, et al. An effective cytokine combination for *ex vivo* expansion of porcine muscle stem cells[J]. *Food Bioscience*, 2022, 46: 101571.
- [58] KOLKMANN A M, VAN ESSEN A, POST M J, et al. Development of a chemically defined medium for *in vitro* expansion of primary bovine satellite cells[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2022, 10: 895289.
- [59] SONG W J, LIU P P, ZHENG Y Y, et al. Production of cultured fat with peanut wire-drawing protein scaffold and quality evaluation based on texture and volatile compounds analysis[J]. *Food Research International*, 2022, 160: 111636.
- [60] FANALI G, MASI A D, TREZZA V, et al. Human serum albumin: From bench to bedside[J]. *Molecular Aspects of Medicine*, 2012, 33(3): 209–290.
- [61] FITZSIMMONS J S, SANYAL A, GONZALEZ C, et al. Serum-free media for periosteal chondrogenesis *in vitro*[J]. *Journal of Orthopaedic Research*, 2004, 22(4): 716–725.
- [62] KEENAN J, PEARSON D, CLYNES M. The role of recombinant proteins in the development of serum-free media[J]. *Cytotechnology*, 2006, 50 (1/2/3): 49–56.
- [63] 郟正刚, 马海燕, 王世聪. 重组人血白蛋白在哺乳动物细胞培养中的应用[J]. *中国生物制品学杂志*, 2016, 29(1): 110–112.
- QIE Z G, MA H Y, WANG S C. The application of recombinant human albumins in mammalian cell culture[J]. *Chinese Journal of Biologicals*, 2016, 29 (1): 110–112.
- [64] SCHANBACHER F L, GOODMAN R E, TALHOUK R S. Bovine mammary lactoferrin: Implications from messenger ribonucleic acid (Mrna) sequence and regulation contrary to other milk proteins[J]. *Journal of Dairy Science*, 1993, 76(12): 3812–3831.
- [65] ZAKIN M M, BARON B, GUILLOU F. Regulation of the tissue-specific expression of transferrin gene[J]. *Developmental Neuroscience*, 2002, 24 (2/3): 222–226.
- [66] ZHANG F Z, QIU H, DONG X H, et al. Transferrin improved the generation of cardiomyocyte from human pluripotent stem cells for myocardial infarction repair[J]. *Journal of Molecular Histology*, 2021, 52(1): 87–99.
- [67] 王少刚, 黄彬璐, 杨玉茹. 一种诱导肌卫星细胞分化为肌管的无血清培养方法: CN114891733A [P]. 2022–08–12.
- WANG S G, HUANG B L, YANG Y R. A serum-free culture method for inducing differentiation of

- muscle satellite cells into myotubes: CN114891733A [P]. 2022-08-12.
- [68] THEOCHARIS A D, SKANDALIS S S, GIALELI C, et al. Extracellular matrix structure[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2016, 97: 4-27.
- [69] DALEY W P, PETERS S B, LARSEN M. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine[J]. *Journal of Cell Science*, 2008, 121(3): 255-264.
- [70] SCHNITTERT J, BANSAL R, STORM G, et al. Integrins in wound healing, fibrosis and tumor stroma: High potential targets for therapeutics and drug delivery[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2018, 129: 37-53.
- [71] JÄRVELÄINEN H, SAINIO A, KOULU M, et al. Extracellular matrix molecules: Potential targets in pharmacotherapy[J]. *Pharmacological Reviews*, 2009, 61(2): 198-223.
- [72] 周光宏, 丁世杰, 徐幸莲. 培养肉的研究进展与挑战[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(5): 1-11.  
ZHOU G H, DING S J, XU X L. Progress and challenges in cultured meat[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2020, 20(5): 1-11.
- [73] FLEISCHMAJER R, MACDONALD E D, PERLISH J S, et al. Dermal collagen fibrils are hybrids of type I and type III collagen molecules[J]. *Journal of Structural Biology*, 1990, 105(1/2/3): 162-169.
- [74] 南学敏. 羊骨胶原蛋白肽抗氧化活性及氨基酸组成分析[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2019.  
NAN X M. Antioxidant activity and acid composition of collagen peptide in sheep bone[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2019.
- [75] 朱静静, 杨旭, 周昌瑜, 等. 鹅皮胶原蛋白肽对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 IEC-6 细胞氧化损伤的保护作用[J]. *中国食品学报*, 2018, 18(6): 33-39.  
ZHU J J, YANG X, ZHOU C Y, et al. Protective effect of collagen peptides from goose skin against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative injury in IEC-6 Cells[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2018, 18(6): 33-39.
- [76] 毛瑞雪, 刘睿, 刘欣然, 等. 胶原蛋白肽生理功能的研究进展[J]. *中国食物与营养*, 2021, 27(7): 49-53.  
MAO R X, LIU R, LIU X R, et al. Research progress on physiological function of collagen peptides [J]. *Food and Nutrition in China*, 2021, 27(7): 49-53.
- [77] 张静, 席玉松, 张俊杰. 3D 打印中胶原蛋白应用的研究进展[J]. *食品工业*, 2020, 41(3): 210-213.  
ZHANG J, XI Y S, ZHANG J J. Advances in the application of collagen in 3D printing[J]. *The Food Industry*, 2020, 41(3): 210-213.
- [78] YAMADA K M, KENNEDY D W. Fibroblast cellular and plasma fibronectin are similar but not identical[J]. *The Journal of Cell Biology*, 1979, 80(2): 492-498.
- [79] YAMADA K M, OLDEN K. Fibronectins—adhesive glycoproteins of cell surface and blood[J]. *Nature*, 1978, 275(5677): 179-184.
- [80] DURBEEJ M. Laminins [J]. *Cell and Tissue Research*, 2010, 339(1): 259-268.
- [81] HALLMANN R, HORN N, SELG M, et al. Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature [J]. *Physiological Reviews*, 2005, 85(3): 979-1000.
- [82] 葛福临. 不同类型的蛋白在材料表面的吸附力及其对干细胞分化影响的初探[D]. 重庆: 重庆大学, 2020.  
GE F L. Adsorption forces of various proteins on substrates and its effect on stem cell differentiation [D]. Chongqing: Chongqing University, 2020.
- [83] WAGENSEIL J E, MECHAM R P. New insights into elastic fiber assembly[J]. *Birth Defects Research Part C Embryo Today Reviews*, 2010, 81(4): 229-240.
- [84] MUIZNIKES L D, WEISS A S, KEELEY F W. Structural disorder and dynamics of elastin[J]. *Biochemistry & Cell Biology—biochimie Et Biologie Cellulaire*, 2010, 88(2): 239-250.
- [85] VYAVAHARE N R, ISENBURG J C, SIMIONESCU D T. Elastin stabilization of connective tissue: US8435553B2[P]. 2007-08-07.
- [86] HINEK A, BODNARUK T D, BUNDA S, et al. Neuraminidase-1, a subunit of the cell surface elastin receptor, desialylates and functionally inactivates adjacent receptors interacting with the mitogenic growth factors PDGF-BB and IGF-2[J]. *American Journal of Pathology*, 2008, 173(4): 1042-1056.
- [87] HINEK A. Nature and the multiple functions of the 67-kD elastin-laminin binding protein[J]. *Cell Adhesion and Communication*, 1994, 2(3): 185-193.

- [88] ZHENG Y Y, CHEN Y, ZHU H Z, et al. Production of cultured meat by culturing porcine smooth muscle cells *in vitro* with food grade peanut wire-drawing protein scaffold[J]. Food Research International, 2022, 159: 111561.
- [89] HOCKNEY R C. Recent developments in heterologous protein production in *Escherichia coli*[J]. Trends in Biotechnology, 1994, 12(11): 456-463.
- [90] MA Y, YU J Y, LIN J L, et al. High efficient expression, purification, and functional characterization of native human epidermal growth factor in *Escherichia coli* [J]. Biomed Reserch International, 2016, 2016: 3758941.
- [91] KO H, KANG M, KIM M J, et al. A novel protein fusion partner, carbohydrate-binding module family 66, to enhance heterologous protein expression in *Escherichia coli*[J]. Microbial Cell Factories, 2021, 20(1): 232.
- [92] NGUYEN M T, HEO Y, DO B H, et al. Bacterial overexpression and purification of soluble recombinant human serum albumin using maltose-binding protein and protein disulphide isomerase[J]. Protein Expression and Purification, 2020, 167: 105530.
- [93] 吕丹, 闫亚丽, 景丽芳, 等. 重组人胰岛素原在大肠杆菌中的可溶性表达[J]. 天津科技大学学报, 2017, 32(6): 21-25.  
LÜ D, YAN Y L, JING L F, et al. Soluble expression of recombinant human proinsulin in *E. coli* [J]. Journal of Tianjing University of Science & Technology, 2017, 32(6): 21-25.
- [94] 李瑛琦, 垄劲松, 许正宏, 等. III型类人胶原蛋白在大肠杆菌重组表达及发酵制备[J]. 微生物学通报, 2020, 47(12): 4164-4171.  
LI Y Q, GONG J S, XU Z H, et al. Recombinant expression and fermentation of type III human-like collagen in *Escherichia coli*[J]. Microbiology, 2020, 47(12): 4164-4171.
- [95] 赵轶君, 刘莹, 薛添, 等. 类人弹性蛋白在大肠杆菌中的高效表达[J]. 科学技术与工程, 2014, 14(28): 269-273.  
ZHAO Y J, LIU Y, XUE T, et al. High-level expression of human elastin-like polypeptide in *Escherichia coli*[J]. Science Technology and Engineering, 2014, 14(28): 269-273.
- [96] 周晗, 陈宁, 赖云, 等. 一种重组人纤连蛋白,其制备方法和应用: CN115785280A[P]. 2023-03-14.  
ZHOU H, CHEN N, LAI Y, et al. A recombinant human fibronectin, its preparation method and application: CN115785280A[P]. 2023-03-14.
- [97] KARBALAEI M, REZAEI S A, FARSIANI H. *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins[J]. Journal of Cellular Physiology, 2020, 235(9): 5867-5881.
- [98] DEMAIN A L, VAISHNAV P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms[J]. Biotechnology Advances, 2009, 27(3): 297-306.
- [99] 李成成, 黄义德. 毕赤酵母表达系统及其发酵策略[J]. 福建轻纺, 2023(10): 31-36.  
LI C C, HUANG Y D. Expression system and fermentation strategy of *Pichia pastoris*[J]. The Light & Textile Industries of Fujian, 2023(10): 31-36.
- [100] WEINACKER D, RABERT C, ZEPEDA A B, et al. Applications of recombinant *Pichia pastoris* in the healthcare industry[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2013, 44(4): 1043-1048.
- [101] LIU Z M, ZHAO H L, XUE C, et al. Secretory expression and characterization of a recombinant-deleted variant of human hepatocyte growth factor in *Pichia pastoris*[J]. World Journal of Gastroenterology, 2005, 11(45): 7097-7103.
- [102] DAGAR V K, BABBAL, MOHANTY S, et al. Effect of *N*-glycosylation on secretion, stability, and biological activity of recombinant human interleukin-3(hIL-3) in *Pichia pastoris*[J]. 3 Biotech, 2022, 12(9): 221.
- [103] 王爽. hTGF- $\beta$ 3在毕赤酵母系统中的表达、纯化与定性[D]. 广州: 广东药科大学, 2022.  
WANG S. Expression, purification and characterization of hTGF- $\beta$ 3 in *Pichia pastoris*[D]. Guangzhou: Guangdong Pharmaceutical University, 2022.
- [104] MAITY N, JASWAL A S, GAUTAM A, et al. High level production of stable human serum albumin in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant product[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2022, 45(2): 409-424.
- [105] 黄建民, 赵健烽, 朱逸丽, 等. 重组人源纤连蛋白及其在毕赤酵母中的表达方法: CN115785280A[P]. 2023-03-14.  
HUANG J M, ZHAO J F, ZHU Y L, et al. Expression method of recombinant human fibronectin in *Pichia pastoris*: CN115785280A[P]. 2023-03-14.

- [106] 蔡思泽, 王斌. 人源Ⅲ型胶原蛋白在毕赤酵母中的多拷贝重组表达, 鉴定及抗氧化活性分析[J]. 现代食品科技, 2023, 39(3): 129-137.  
CAI S Z, WANG B. Recombinant expression, structural identification, and antioxidant activity analysis of human type Ⅲ collagen in *Pichia pastoris*[J]. Modern Food Science & Technology, 2023, 39(3): 129-137.
- [107] HOU J, TYO K, LIU Z H, et al. Metabolic engineering of recombinant protein secretion by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Fems Yeast Research, 2012, 12(5): 491-510.
- [108] DE BRABANDER P, UITTERHAEGEN E, DELMULLE T, et al. Challenges and progress towards industrial recombinant protein production in yeasts: A review [J]. Biotechnology Advances, 2023, 64: 108-121.
- [109] CHO J S, OH H J, JANG Y E, et al. Synthetic propeptide design to enhance the secretion of heterologous proteins by *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Microbiologyopen, 2022, 11(3): e1300.
- [110] MOROZKINA E V, MARCHENKO A N, KERUCHENKO J S, et al. Proteinase B disruption is required for high level production of human mechano-growth factor in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2010, 18(3): 188-194.
- [111] LEI Q, MA J, DU G, et al. Efficient expression of a cytokine combination in *Saccharomyces cerevisiae* for cultured meat production[J]. Food Research International 2023, 170: 113017.
- [112] 关欣, 周景文, 堵国成, 等. 培育肉生产技术研究[J]. 中国工程科学, 2021, 23(6): 178-186.  
GUAN X, ZHOU J W, DU G C, et al. Development of cultured meat technology in China [J]. Strategic Study of CAE, 2021, 23(6): 178-186.
- [113] 商瑜, 张启明, 李悦, 等. 动物细胞无血清培养基的发展和应[J]. 陕西师范大学学报(自然科学版), 2015, 43(4): 68-72.  
SHANG Y, ZHANG Q M, LI Y, et al. Progress on serum-free media of zooblast[J]. Journal of Shaanxi Normal University: Natural Science Edition, 2015, 43(4): 68-72.
- [114] DAI W J, CHEN Y W, XIONG W L, et al. Development of a serum-free medium for myoblasts long-term expansion and 3D culture for cell-based meat [J]. Journal of Food Science, 2024, 89 (2): 851-865.
- [115] STIG S, FEVEILE Y J, NAVID S, et al. A simple and robust serum-free media for the proliferation of muscle cells[J]. Food Research International, 2023, 172: 113194-113194.
- [116] 陈敏, 刘旭平, 赵亮. 支持高密度 BHK-21 细胞培养和高产 FMD 病毒的无血清培养基开发与优化[J]. 生物技术通报, 2020, 36(10): 62-71.  
CHEN M, LIU X P, ZHAO L. Development and optimization of serum-free medium for high-density culture of suspended BHK-21 cells and high-yield of FMD virus[J]. Biotechnology Bulletin, 2020, 36 (10): 62-71.
- [117] 庄英萍, 田锡炜, 张嗣良. 基于多尺度参数相关分析的细胞培养过程优化与放大[J]. 生物产业技术, 2018, 1: 49-55.  
ZHUANG Y P, TIAN X W, ZHANG S L. Cell culture process optimization and scale-up based on multi-scale parameter related analysis[J]. Biotechnology & Business, 2018, 1: 49-55.
- [118] MAILLOT C, SION C, DE ISLA N, et al. Quality by design to define critical process parameters for mesenchymal stem cell expansion [J]. Biotechnology Advances, 2021, 50: 107765.
- [119] YANG M, WANG Q, ZHU Y Y, et al. Cell culture medium cycling in cultured meat: Key factors and potential strategies[J]. Trends in Food Science & Technology, 2023, 138: 564-576.
- [120] 朱紫瑜, 王冠, 庄英萍. 大规模哺乳动物细胞培养工程的现状与展望[J]. 合成生物学, 2021, 2(4): 612-634.  
ZHU Z Y, WANG G, ZHUANG Y P. Present situation and prospect for large-scale mammalian cell culture engineering [J]. Synthetic Biology Journal, 2021, 2(4): 612-634.
- [121] 李雪良, 张国强, 赵鑫锐, 等. 细胞培养肉规模化生产工艺及反应器展望[J]. 过程工程学报, 2020, 20(1): 3-11.  
LI X L, ZHANG G Q, ZHAO X R, et al. Prospects of process and bioreactors for large scale cultured meat production[J]. The Chinese Journal of Process Engineering, 2020, 20(1): 3-11.
- [122] 夏建业, 谢明辉, 储炬, 等. 生物反应器流场特性研究及其在生物过程优化与放大中的应用研究[J]. 生物产业技术, 2018(1): 41-48.

- XIA J Y, XIE M H, CHU J, et al. Study of fluid dynamics in bioreactors and its application in bioprocess optimization and scale-up[J]. *Biotechnology & Business*, 2018(1): 41-48.
- [123] DODGE T, LUNDQVIST P, CHOTANI G. Scale down of production conditions in the laboratory[J]. *Chemical Engineering Transactions*, 2011, 24: 901-906.
- [124] WANG G, HARINGA C, NOORMAN H, et al. Developing a computational framework to advance bioprocess scale-up[J]. *Trends Biotechnol*, 2020, 38(8): 846-856.
- [125] YOSHIMOTO Y, IKEMOTO-UEZUMI M, HITACHI K, et al. Methods for accurate assessment of myofiber maturity during skeletal muscle regeneration[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2020, 8: 267.
- [126] 朱宏星, 孙冲, 王道营, 等. 肌红蛋白理化性质及肉色劣变影响因素研究进展[J]. *肉类研究*, 2019, 33(6): 55-63.
- ZHU H X, SUN C, WANG D Y, et al. Progress in the physicochemical properties of myoglobin and factors influencing meat color stability[J]. *Meat Research*, 2019, 33(6): 55-63.
- [127] 曾祥辉, 王焕, 李步苏, 等. 三种不同游泳习性鱼类骨骼肌的快、慢肌纤维组织学特性[J]. *渔业科学进展*, 2023, 44(3): 245-252.
- ZENG X H, WANG H, LI B S, et al. Histological characteristics of fast and slow muscle fibers in skeletal muscle of fishes with three different swimming habits[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2023, 44(3): 245-252.
- [128] 刁小琴, 王莹, 贾瑞鑫, 等. 动物性脂肪对肉品风味影响机制研究进展[J]. *肉类研究*, 2022, 36(3): 45-51.
- DIAO X Q, WANG Y, JIA R X, et al. Progress in understanding the mechanism of the influence of animal fat on meat flavor[J]. *Meat Research*, 2022, 36(3): 45-51.
- [129] 王小亚, 唐宏, 陈大海, 等. 高、低肌内脂肪含量的贵州黄鸡的肉品质研究[J]. *饲料研究*, 2022, 45(15): 102-105.
- WANG X Y, TANG H, CHEN D H, et al. Study on meat quality of Guizhou yellow chickens with high and low intramuscular fat content[J]. *Feed Research*, 2022, 45(15): 102-105.
- [130] MORIGNY P, BOUCHER J, ARNER P, et al. Lipid and glucose metabolism in white adipocytes: Pathways, dysfunction and therapeutics [J]. *Nature Reviews Endocrinology*, 2021, 17(5): 276-295.
- [131] 庄合林, 林亚秋, 杨公社. 维生素 C 通过调控脂肪形成相关基因的转录促进猪前体脂肪细胞的增殖与分化[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2007, 23(6): 499-507.
- ZHUANG H L, LIN Y Q, YANG G S. Vitamin C promotes proliferation and differentiation of porcine preadipocytes by modulating transcription of adipogenesis-related genes[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2007, 23(6): 499-507.
- [132] 尚文斌, 杨颖, 姜博仁, 等. 人参皂苷 Rb1 促进 3T3-L1 脂肪细胞分化并抑制脂解[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2007, 23(3): 258-263.
- SHANG W B, YANG Y, JIANG B R, et al. Ginsenoside Rb<sub>1</sub> facilitates adipocyte differentiation and inhibits lipolysis in 3T3-L1 adipocytes[J]. *Chinese Journal of Endocrinology and Metabolism*, 2007, 23(3): 258-263.
- [133] JEON Y G, KIM Y Y, LEE G, et al. Physiological and pathological roles of lipogenesis [J]. *Nature Metabolism*, 2023, 5(5): 735-759.
- [134] FRAEYE I, KRATKA M, VANDENBURGH H, et al. Sensorial and nutritional aspects of cultured meat in comparison to traditional meat: Much to be inferred[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2020, 7: 35.
- [135] MONTESANO D, COSSIGNANI L, GIUA L, et al. A simple HPLC-ELSD method for sugar analysis in Goji berry [J]. *Journal of Chemistry*, 2016, 2016: 6271808.
- [136] LEE C W, LEE J R, KIM M K, et al. Quality improvement of pork loin by dry aging [J]. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 2016, 36(3): 369-376.
- [137] MA X Y, YU M, LIU Z C, et al. Effect of amino acids and their derivatives on meat quality of finishing pigs[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2020, 57(2): 404-412.
- [138] FU Y C, CAO S Y, YANG L, et al. Flavor formation based on lipid in meat and meat products: A review[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2022, 46(12): e14439.
- [139] CALVO L, SEGURA J, TOLDRA F, et al. Meat

- quality, free fatty acid concentration, and oxidative stability of pork from animals fed diets containing different sources of selenium[J]. *Food Science and Technology International*, 2017, 23(8): 716–728.
- [140] LEGGIO A, BELSITO E L, DE MARCO R, et al. Simultaneous extraction and derivatization of amino acids and free fatty acids in meat products[J]. *Journal of Chromatography A*, 2012, 1241: 96–102.
- [141] RAEES S, ULLAH F, JAVED F, et al. Classification, processing, and applications of bioink and 3D bioprinting: A detailed review[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 232: 123476.
- [142] YEN F C, GLUSAC J, LEVI S, et al. Cultured meat platform developed through the structuring of edible microcarrier-derived microtissues with oleogel-based fat substitute [J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 2942.
- [143] ADAMIAK K, SIONKOWSKA A. Current methods of collagen cross-linking: Review [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 161: 550–560.
- [144] IANOVICI I, ZAGURY Y, REDENSKI I, et al. 3D-printable plant protein-enriched scaffolds for cultivated meat development[J]. *Biomaterials*, 2022, 284: 121487.
- [145] WAGNER K C, BYRD G D. Evaluating the effectiveness of clinical medical librarian programs: A systematic review of the literature[J]. *Journal of the Medical Library Association*, 2004, 92(1): 14–33.
- [146] WOLLSCHLAEGER J O, MAATZ R, ALBRECHT F B, et al. Scaffolds for cultured meat on the basis of polysaccharide hydrogels enriched with plant-based proteins[J]. *Gels*, 2022, 8(2): 94.
- [147] PARK S, JUNG S, CHOI M, et al. Gelatin MAGIC powder as nutrient-delivering 3D spacer for growing cell sheets into cost-effective cultured meat [J]. *Biomaterials*, 2021, 278: 121155.
- [148] ZHANG H J, JIN C M, LV S H, et al. Study on electrospinning of wheat gluten: A review[J]. *Food Research International*, 2023, 169: 112851.
- [149] WANG M M, WANG Y, PAN P, et al. A high molecular weight silk fibroin scaffold that resists degradation and promotes cell proliferation[J]. *Biopolymers*, 2023, 114(7): e23554.
- [150] ZHOU X M, CHENG R, WANG B, et al. Biodegradable sandwich-architected films derived from pea starch and polylactic acid with enhanced shelf-life for fruit preservation[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2021, 251: 117117.
- [151] JONES J D, THYDEN R, PERREAULT L R, et al. Decellularization: Leveraging a tissue engineering technique for food production[J]. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2023, 9(5): 2292–2300.
- [152] XU E B, NIU R H, LAO J H, et al. Tissue-like cultured fish fillets through a synthetic food pipeline [J]. *NPJ Science of Food*, 2023, 7(1): 17.
- [153] 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: 20.
- [154] 关欣, 周景文, 堵国成, 等. 细胞培养肉产业技术发展态势及建议[J]. *中国工程科学*, 2023, 25(3): 251–262.
- GUAN X, ZHOU J W, DU G C, et al. Technological trend and suggestions for cultured meat industry [J]. *Strategic Study of CAE*, 2023, 25(3): 251–262.
- [155] XIANG N, ZHANG X M. The challenges of bringing cultured meat to the market[J]. *Nature Reviews Bioengineering*, 2023, 1(11): 791–792.
- [156] 关欣, 汪丹丹, 方佳华, 等. 细胞培养肉技术: 研究进展与未来展望[J]. *中国食品学报*, 2022, 22(12): 1–13.
- GUAN X, WANG D D, FANG J H, et al. Cultured meat technology: Advances and future perspectives [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2022, 22(12): 1–13.
- [157] RISNER D, LI F, FELL J S. Preliminary techno-economic assessment of animal cell-based meat [J]. *Foods*, 2021, 10: 3.
- [158] ALLAN S J, DE BANK P A, ELLIS M J. Bioprocess design considerations for cultured meat production with a focus on the expansion bioreactor [J]. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 2019, 3: 44.
- [159] BODIOU V, MOUTSATSOU P, POST M. Microcarriers for upscaling cultured meat production[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2020, 7: 10.
- [160] LI X L, ZHANG G Q, ZHAO X R, et al. A con-

ceptual air–lift reactor design for large scale animal cell cultivation in the context of *in vitro* meat pro-

duction[J]. *Chemical Engineering Science*, 2020, 211: 115269.

## Biological Basis for Efficient Synthesis of Cultured Meat and Technical Challenges

Guan Xin<sup>1</sup>, Zhou Jingwen<sup>1</sup>, Wang Shouwei<sup>2</sup>, Li Chunbao<sup>3</sup>, Chen Jian<sup>\*</sup>

(<sup>1</sup>Science Center for Future Foods, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu

<sup>2</sup>China Meat Research Center, Beijing 100068

<sup>3</sup>College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

**Abstract** With the increasing level of social development, the global consumption of meat products is growing rapidly. Cultured meat is a revolution in agri–food science and technology. With the rapid development of cultured meat engineering technology in the international arena, the gap in this regard in China has gradually emerged. This work reviewed the biological basis for efficient synthesis of cultured meat, including the mechanism of functional maintenance and developmental process of animal cells, the summary of animal cell growth factors and their synthesis strategies, the key technologies of the large–scale and low–cost culture of animal cells, and the biological process for improving the edible quality of cultured meat. Furthermore, this study discussed the technological challenges for industrialized manufacturing of cultured meat, and then provided a perspective on the future focus of cultured meat technology, so as to provide a theoretical and practical basis for achieving sustainable biomanufacturing of cultured meat.

**Keywords** cultured meat; food synthetic biology; engineering; low cost; large scale