

Dosezi u proizvodnji nadomjestaka mesa i mlijeka pomoću stanica

Igor Slivac^{1*}, Kristina Radošević¹, Višnja Gaurina Srček¹

Sažetak

Povećanje broja stanovnika vodi k povećanoj potražnji za hranom. Zato je vrlo važno baviti se usklađivanjem povećane proizvodnje hrane sa smanjenjem štetnog utjecaja na okoliš kojeg ima globalno širenje poljoprivrede. Novo područje biotehnologije, nazvano stanična poljoprivreda, moglo bi doprinijeti rješavanju ovog problema. Stanična poljoprivreda nudi drugačije proizvodne sustave za mnoge proizvode životinjskog i biljnog podrijetla koji se danas dobivaju stočarstvom ili poljodjelstvom. Meso i mlijeko dva su takva proizvoda, a proizvodnja njihovih analoga primjenom stanične poljoprivrede cilj je sve većeg broja tvrtki širom svijeta. One razvijaju tehnologiju oslanjajući se na iskustva stečena u tkivnom inženjerstvu i bioprocima sa životinjskim stanicama. U ovom radu donosimo pregled novih tehnologija koje se temelje na uzgoju kulture stanica za dobivanje tzv. *in vitro* kultiviranog mesa i analoga mlijeka. Također raspravljamo o kvaliteti navedenih proizvoda te potrebama i održivosti njihove proizvodnje.

Ključne riječi: stanična poljoprivreda, biotehnologija, kultivirano meso, nadomjestak mlijeka

Uvod

Dostupnost i kvaliteta hrane ključne su odrednice opstanka i razvoja suvremenog ljudskog društva. Proteini spadaju među najvažnije nutrijente u ljudskoj prehrani, a proizvodi životinjskog porijekla njihov su najznačajniji izvor. Stočarstvo, kao grana poljoprivrede, od svog je nastanka bilo temelj za proizvodnju namirnica bogatih proteinima (meso, mlijeko, jaja). Prva poljoprivredna revolucija započela je prije više od deset tisuća godina čovjekovim pripitomljavanjem životinja, poglavito kao izvora hrane. Stalna nastojanja da se od domesticiranih životinja (stoke, peradi, riba i sl.) osigu-

ra što veća količina i prinos proizvoda, ostvarivala su se selekcijom i križanjem najboljih pasmina te povećanjem uzgojnih kapaciteta. U razvijenom svijetu danas prevladava uzgoj stoke na farmama, tj. uzgoj jedne vrste životinja na specijaliziranom poljoprivrednom dobru. Prema podacima Organizacije za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda (FAO, www.fao.org), ovakav uzgoj životinja osigurava čovječanstvu trećinu proteina neophodnih za prehranu, izvor je prihoda za više od milijardu ljudi i doprinosi plodnosti tla. Porast broja stanovnika na Zemlji i poboljšanje životnog standarda neizbježno

¹ dr. sc. Igor Slivac, izvanredni profesor; dr. sc. Kristina Radošević, izvanredna profesorica; dr. sc. Višnja Gaurina Srček, redovita profesorica Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije, Zagreb
**Autor za korespondenciju: e-mail:islivac@pbf.unizg.hr*

vodi k povećanoj potražnji za hranom, a posljedično i za sirovinama te površinama potrebnim za njenu proizvodnju. Prema dostupnim podacima, uzgoj stoke uzrokuje emisiju 15 % stakleničkih plinova koji su prepoznati kao katalizator globalnog zagrijavanja. Oko trećine ledom nepokrivenog kopna planete te oko 16% zaliha slatke vode namijenjeno je uzgoju stoke. Ovakav trend posljednjih nekoliko desetljeća doveo je do pojave neželjenih učinaka, posebno na okoliš, a potaknuo je i etička razmišljanja o dobrobiti životinja uzgajanih na farmama. Odšumljavanje krajolika radi sijanja monokultura za prehranu životinja erodira tlo, kontaminira okoliš pesticidima i nitratima te dokida ekološku raznolikost (Foley i sur., 2011., Springmann i sur., 2018.). Osim navedenog, prekomjerno korištenje antibiotika u stočarstvu potiče razvoj rezistentnih bakterija te prijeti zdravlju kako životinja tako i ljudi (Many-Loh i sur., 2018.). Nadalje, postoji opasnost i od pojave novih zoonoza kao posljedice kontakta čovjeka s oboljelim životinjama u prenatrpanim farmama. U skretanju s očito fatalnog puta kojim je stočarstvo krenulo unazad nekoliko desetljeća, svjetska zajednica oslanja se na dva strateška plana UN-a iz 2015. godine: Pariški sporazum o klimatskim promjenama i Agenda 2030 (www.unfccc.int). Njima se potiče razvoj ekološki prihvatljive i resursno održive poljoprivrede. Temelj provedbe ovih planova su načela permakulture tj. sprega integrativne poljoprivrede i primjene obnovljivih izvora energije, dok uspješnost njihove provedbe pored pedo-klimatskih, ovisi i o socio-ekonomskim prilikama područja. Nažalost, nepredvidivost svjetskih zbivanja, primjerice pojava panedmije ili geopolitičke nepovoljnosti neodređenog trajanja, mogu narušiti pravovremeno i ujednačeno dostizanje ciljeva zacrtanih globalnim i nacionalnim strateškim planovima.

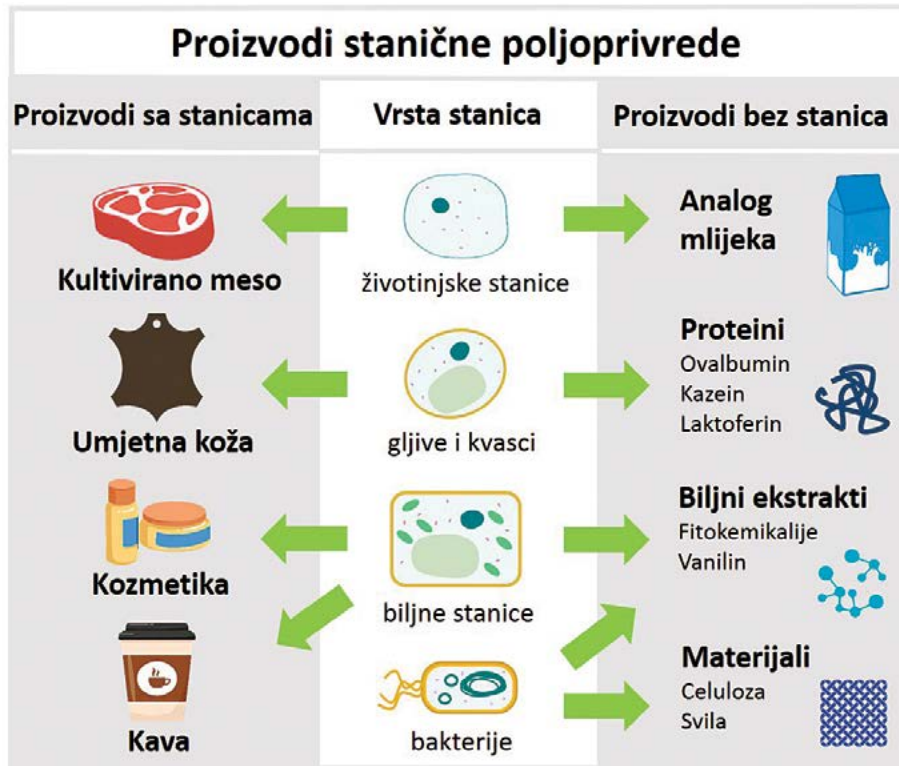
Težište ovog rada je prikazati najnovija dostignuća u tehnologiji proizvodnje mesa i mlijeka, odnosno njihovih nadomjestaka pomoću kulture životinjskih stanica. Primjena kulture životinjskih stanica sastavni je dio suvremene biotehnologije još od 50-ih godina prošlog stoljeća i njeni proizvodi daju nemjerljiv doprinos farmaceutskoj industriji i biomedicini (Verma i sur., 2020.). Temelj tehnologije je uzgoj stanica izoliranih iz različitih životinjskih tkiva i prilagođenih na uvjete koji im omogućuju normalan rast izvan njihove prirodne sredine. Stanice koje se koriste najčešće su naknadno genetički izmjenjene kako bi se potaknulo ili pospješi-

lo dobivanje željenih proizvoda, a koje uglavnom čine rekombinantni proteini i virusna cjepiva. Proizvod tehnologije mogu biti i same stanice koje se primjenjuju u terapiji matičnim stanicama ili u tkivnom inženjerstvu. Znatna napredak ove tehnologije te sve veća osvještenost potrošača o etičkim i ekološkim manjkavostima uzgoja životinja, potaknuo je istraživanja i razvoj novih proizvoda, naročito hrane. Pritom se nastoji minimalizirati ili posve izbjeći postupci ciljne modifikacija genoma stanica koje se koriste. Prema našem saznanju, ovo je prvi rad na hrvatskom jeziku koji daje pregled proizvodnje nadomjestaka mesa i mlijeka pomoću kulture stanica.

Stanična poljoprivreda

U posljednjih desetak godina kao alternativa globalnim agendama održive poljoprivrede pojavljuje se tehnologija kojom se hrana i drugi poljoprivredni proizvodi ne dobivaju iz uzgojnih životinja ili usjeva, već pomoću kulture stanica (životinjskih, biljnih ili mikrobnih). Oslanjajući se na načela tradicionalne biotehnologije povećava se ponuda novih vrsta proizvoda koji kvalitetom postaju sve sličniji, ili čak bolji u usporedbi sa svojim pretečama. Naziv ove tehnologije je stanična poljoprivreda (SP), što je doslovan prijevod engleske inačice *cellular agriculture*. Velika prednost SP je neovisnost proizvodnje o tlu, klimi i bolestima. Također, radi se o tehnologiji visokog iskorištenja, tj. pretvorba sirovina u proizvod daje manje nusproizvoda ili otpada za zbrinjavanje nego tradicionalni postupci proizvodnje. Proizvodi SP mogu se svrstati u dvije skupine: proizvodi sa i bez stanica (engl. *cellular and acellular products*) (slika 1).

Trenutno najznačajniji i stručnjacima najizazovniji proizvod SP koji sadrži stanice ima neobično mnogo naziva na engleskom jeziku: *cultured meat, clean meat, lab meat, in vitro meat, artificial meat, no-kill meat* itd. od kojih se najviše koristi prvi navedeni. Zato u ovom radu autori dogovorno koriste izraz kultivirano meso. Radi se o prehranbenom proizvodu koji se promovira, a primjerice u Singapuru od prosinca 2020. godine i prodaje kao zamjena za meso i mesne preradevine. Sastoji se uglavnom od mišićnih i masnih stanica te neke vrste veziva, odnosno nosača za stanice. O ovoj vrsti proizvoda bit će više riječi u nastavku teksta. Određeni kozmetički proizvodi za njegu kože u svom sastavu sadrže cijele stanice. Radi se o matičnim stanicama biljaka koje sadrže spojeve s regene-



Slika 1. Prikaz glavnih skupina proizvoda stanične poljoprivrede
Figure 1 Main types of products of cellular agriculture

rativnim djelovanjem i koje se nakon uzgoja osuše pa dodaju u kozmetičke pripravke (Georgiev i sur., 2018.). Istraživači u Finskoj nedavno su od biomase osušenih stanica uzgojenih *in vitro*, a izdvojenih iz lista kavovca, proizveli napitak koji senzorski i djelovanjem nalikuje kavi (Eibl i sur., 2018.) U skupinu proizvoda sa stanicama spadaju i proizvodi od materijala koji nalikuju životinjskoj koži. Dobivaju se obradom micelija kultiviranih gljiva, a koriste u izradi odjeće te u kombinaciji s pamukom kao prirodni materijal za pakiranje (Papp i sur., 2017., Holt i sur., 2012.).

Prirodni proizvodi koji u sebi ne sadrže stanice, ili tzv. acelularni proizvodi, u tehnološkom smislu nisu neka novost. Naime, znatan broj istih proizvodi se već desetljećima kontroliranim biotehničkim postupcima u velikom mjerilu, poput hrane i pića dobivenih fermentacijom, raznih lijekova dobivenih biokonverzijom spojeva ili virusnih cjepiva dobivenih infekcijom kultiviranih stanica. Međutim, kad se govori o proizvodima bez stanica u području SP, onda se misli na analoge proizvoda koji se tradicionalno dobivaju stočarstvom, poljodjelstvom i sl. Neki od tih zamjenskih proizvoda ističu se na tržištu oznakom da ne sadrže sastojke životinjskog porijekla (engl. *animal prote-*

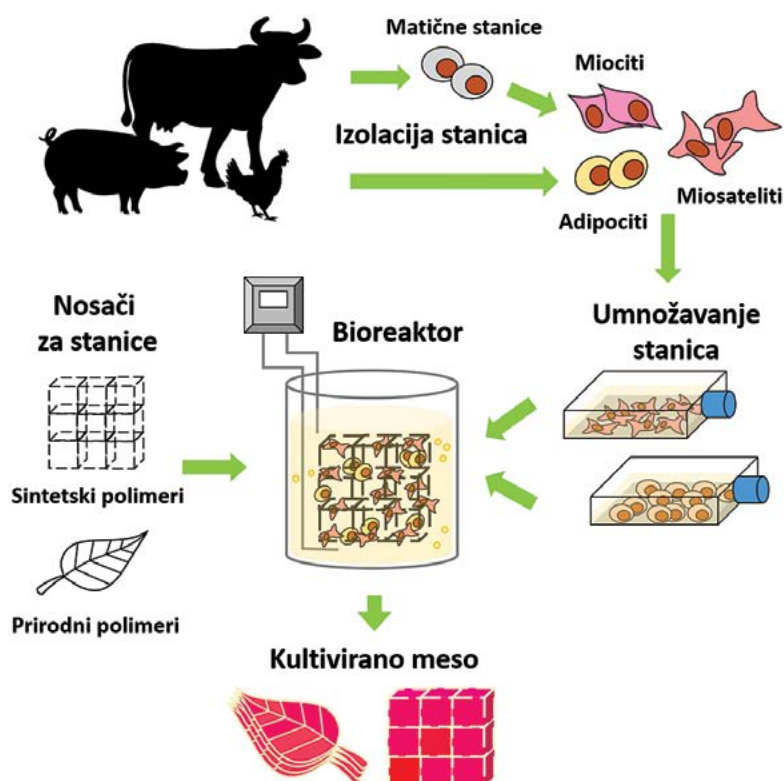
in-free food, animal-free fashion). Objema skupinama acelularnih proizvoda zajedničko je da ih se nizom separacijskih postupaka odvaja od stanica koje su ih proizvele. Jedan od najsloženijih acelularnih proizvoda SP je mlijeko, odnosno njegovi nadomjestci. Najranije razvijeni postupci temeljili su se na biotehničkom proizvodnji proteina mlijeka, kazeina, albumina i laktoferina, pomoću genetički modificiranih stanica kvasca. Pročišćeni proteini zatim se pomiješaju s laktozom, lipidima i drugim dodacima te se izrađuju različite formulacije mliječnog napitka (Hettinga i Bijl, 2022.). Najnovija acelularna tehnologija proizvodnje nadomjestaka mlijeka, o kojoj će biti više riječi kasnije, uključuje uzgoj *in vitro* epitelnih stanica vimena koje daju proizvod sastava sličnog prirodnom mlijeku. Protein kokošjih jaja, tzv. ovalbumin, proizvodi se sličnom tehnikom uz primjenu rekombinantne DNA u stanicama kvasca ili micelijima gljiva (Diwan i sur., 2021.). Razne kemikalije biljnog porijekla tzv. fitokemikalije imaju značajnu ulogu u kozmetici, farmaceutici i pripremi hrane. One se tradicionalno izoliraju iz biljaka samoniklih u prirodi ili uzgojenih na plantažama. Primjenom tehnologije SP, nema potrebe za traženjem, sjetvom niti žetvom biljaka, već se koriste biljne matične stanice koje se uzgajaju *in*

vitro te potom podvrgavaju ekstrakciji. Dobiveni ekstrakti se pročišćavaju te se iz njih izdvajaju željezni kemijski spojevi (Eibl i sur., 2018.). Neki proizvodi biljaka, poput vanilina, mogu se dobiti i biokonverzijom pomoću bakterija (Chauve i sur., 2017.). Treća skupina proizvoda koji ne sadrže stanice su biomaterijali čija je primjena u rasponu od medicine do tekstila. Radi se prirodnim polimerima, celulozi i fibroinu svile, koji se umjesto iz biljnog materijala odnosno kukuljice dudova svilca mogu dobiti genetički modificiranim bakterijama uzgajanim na relativno jeftinom supstratu (Mohammadi i sur. 2019., Wang i sur. 2019.). Broj acelularnih proizvoda je u stalnom porastu.

Proizvodnja *in vitro* nadomjestaka mesa

Svjetska potrošnja mesa posljednjih pola stoljeća kontinuirano raste pa ga i proizvodnja slijedi u stopu (Ritchie i Roser, 2017.). Preko 90 % mesa u javnoj potrošnji dolazi iz sustavnog uzgoja (farme, uzgajališta) gdje životinje obitavaju u neprirodnim uvjetima i programirano se hrane kako bi dostigle poželjnu veličinu do klanja. Često je na tržištu prisutna potražnja samo za određenom vrstom mesa pa se događa da više od 30 % trupa životi-

nje završava kao otpad (Van Eenennaam i Werth, 2021.). Ekološki rizici koji prijete zbog uzgoja životinja kao i proizvodnje krmiva spomenuti su u prethodnom poglavlju. Sve navedeno je razlog zbog čega tehnologija proizvodnje kultiviranog mesa, iako još u ranoj fazi, dobiva sve veći globalni značaj. Trenutno se proizvodnjom kultiviranog mesa bavi već pedesetak tvrtki diljem svijeta koje su većinom počele kao *start-up* tvrtke. Dio njih osim pogona za proizvodnju imaju i vlastite restorane za konzumaciju kultiviranog mesa. Za sada su dostupni proizvodi od govedine, svinjetine, peradi, lososa i tune, te kozica. Neke tvrtke pokrenule su proizvodnju kultiviranog mesa divljih životinja radi zaštite izlovljavanjem ugroženih vrsta (*Vow* i *Mogale Meat*). Drugima je pak glavni proizvod životinjska mast iz lipocita koja je pogodna za pripremu hrane (*CubiQ Foods* i *Mission Barns*) (Kyle i sur., 2020.). Prvi proizvod od kultiviranog mesa bio je nalik kosanom odresku i javno je predstavljen 2013. godine. Nastao je na Sveučilištu u Maastrichtu, nakon dvije godine uzgoja i slaganja vrpce od govedih mišićnih vlakana, a vrijednost mu je iznosila oko 300.000 USD. Za usporedbu, sličan proizvod koji danas nudi sveučilišna *spin-off* tvrtka *Mosa Meat* ima cijenu oko 10



Slika 2. Pregled postupka proizvodnje kultiviranog mesa pomoću životinjskih stanica
Figure 2 Production process of cultured meat with animal cells

USD što jasno ukazuje na strelovit napredak tehnologije. Pored visoke cijene, najraniji proizvodi imali su i druge nedostatke, naročito senzorske prirode. Najviše primjedbi odnosilo se na pretjeranu suhoću i lošu konzistenciju proizvoda. Međutim, kombinacijom mišićnih i masnih stanica dobilo se na sočnosti proizvoda. Zadovoljavajuća struktura, žilavost te oblik proizvoda postignuti su korištenjem nosača za prihvaćanje stanica. Dodatak biljnih proteina (i do 30%) također može poboljšati kvalitetu proizvoda. Kultivirano meso najčešće se prodaje kao mesne okruglice, popečci ili burgeri te kobasice. Izraelske tvrtke *MeatTech 3D* i *Aleph Farms* razvijaju primjenu tehnologije 3D-ispisa stanica u polimernom matriksu kako bi proizvod imao svojstva odreska. Pored mišićnih i masnih stanica u sastav uključuju i stanice vaskularnog endotela. Proizvođači koji koriste riblje stanice uspjeli su izraditi analog vrlo nalik prirodnom tkivu pogodnom za pripremu jela poput *sushija* (*Wildtype Foods* i *Finless Food*).

Tehnički, proizvodnja kultiviranog mesa započinje izolacijom matičnih stanica (MS) iz tkiva životinje, najčešće biopsijom (Slika 2). Ove stanice koriste se zato jer posjeduju potencijal rasta i diferencijacije koji su specijalizirane stanice iz tkiva izgubile. Postoji više izvora MS. Jedan je mišićno tkivo u kojem se nalaze miosateliti, vrsta progenitornih stanica od kojih nastaju miotubuli, preteča mišićnih vlakana. Nažalost u tkivu nema mnogo miosatelita, a imaju i manji potencijal diferencijacije u odnosu na druge MS. Zbog toga stručnjaci najradije posežu za embrionalnim ili mezenhimskim MS. I jedne i druge diferenciraju u različite vrste stanica, pa tako i u mišićne (miotubuli) i masne (lipociti) stanice. One se mogu uzgojiti u većoj količini i spremati u banke stanica što onda osigurava dugoročnu zalihu, bez potrebe za novim biopsijama. Primjena induciranih pluripotentnih MS je također moguća, ali ona uključuje genetičku modifikaciju već specijaliziranih stanica radi vraćanja potencijala diferencijacije pa se stoga izbjegava. Nakon izolacije MS, prvi korak je osigurati potrebnu količinu stanica uzgojem *in vitro* u hranjivom mediju. Potom se nadzirani uzgoj stanica prebacuje u sustave većeg mjerila (bioreaktor) pri čemu se stanice zasijavaju na porozne ili vlaknaste nosače (engl. *scaffold*) čiji struktura i oblik određuju svojstva konačnog proizvoda. Tu najprije slijedi diferencijacija MS do tzv. miotubula za što se koristi nekoliko protokola. Najčešće se u hranjivi medij dodaju spojevi regulatori rasta tzv.

citokini koji programirano usmjeravaju diferencijaciju stanica. Nešto složenija, ali učinkovitija je tzv. kondicijska aktivacija ektopične ekspresije transkripcijskih faktora u samim MS (Post i sur., 2020.). Sastav hranjivog medija je jedan od najkritičnijih elemenata uzgoja stanica. Naime radi bolje stanične proliferacije medij mora sadržavati fetalni teleći serum, derivat krvi bogat biokemijskim signalima, što pomalo obesmišljava etičku komponentu cijele tehnologije. Da bi se izbjegla ova zavrzlama, intenzivno se radi na formulacijama medija bez seruma, koji su, međutim, znatno skuplji. Domišljatu alternativu predlaže japanska tvrtka *IntegriCulture* nudeći sklopove za kokultivaciju različitih vrsta stanica koje proizvode signalne molekule namjenjene prihranjivanju stanica mesa u središnjem bioreктору. Sljedeća faza proizvodnog postupka je osigurati uvjete u kojima će miotubuli srasti u mišićna vlakna slična onima u prirodnom tkivu. Pritom važnu ulogu ima vrsta nosača na kojima stanice rastu. Najčešće se radi o hidrogelovima od sintetskih ili prirodnih polimera poput alginata, biljne celuloze ili hitina gljiva koji se posve ili djelomično razgrađuju kako ih stanice obrastaju. Poticaj za razvoj mišićnih vlakana na nosačima postiže se fizičkom ili električnom stimulacijom koja pospješuje sintezu miozina i aktina, dva proteina ključna za elastičnost vlakana (Post i sur. 2020.; Tuomisto 2019.). Uobičajene tehnike uzgoja uključuju regulirano strujanje hranjivog medija u bioreктору i/ili rastezanje nosača sa stanicama, odnosno stvaranje blagog električnog polja (Khodabukus i sur., 2019.). Unos lipocita u proizvod može se provesti za vrijeme uzgoja stanica u bioreктору ili tijekom završne obrade proizvoda kao dodatak agregiranih lipocita već uzgojenim mišićnim vlaknima. U konačan proizvod dodaju se prirodne arome te proteini i lipidi biljnog porijekla. Ekstrudirani proteini nekih uljarica, dobiveni kao nusproizvodi tehnologije ulja, koriste se i kao nosači za prihvaćanje i uzgoj stanica (Ben-Arye i sur., 2020.). Proizvođači često sami nalaze rješenja i stvaraju protokole prilagođene specifičnim zahtjevima proizvodnog postupka. Bitna prednost ove tehnologije je mogućnost određivanja hranjivog sastava proizvoda, posebno udjela proteina, masti i vitamina (B₁₂), što daje potrebnu fleksibilnost u zadovoljavanju ukusa potrošača. Također, u kultiviranom mesu nema parazita te je manje podložno mikrobiološkom kvarenju s obzirom na sterilne uvjete proizvodnje skoro do posljednjeg koraka (Guan i sur., 2021.). Međutim, ovakav proi-

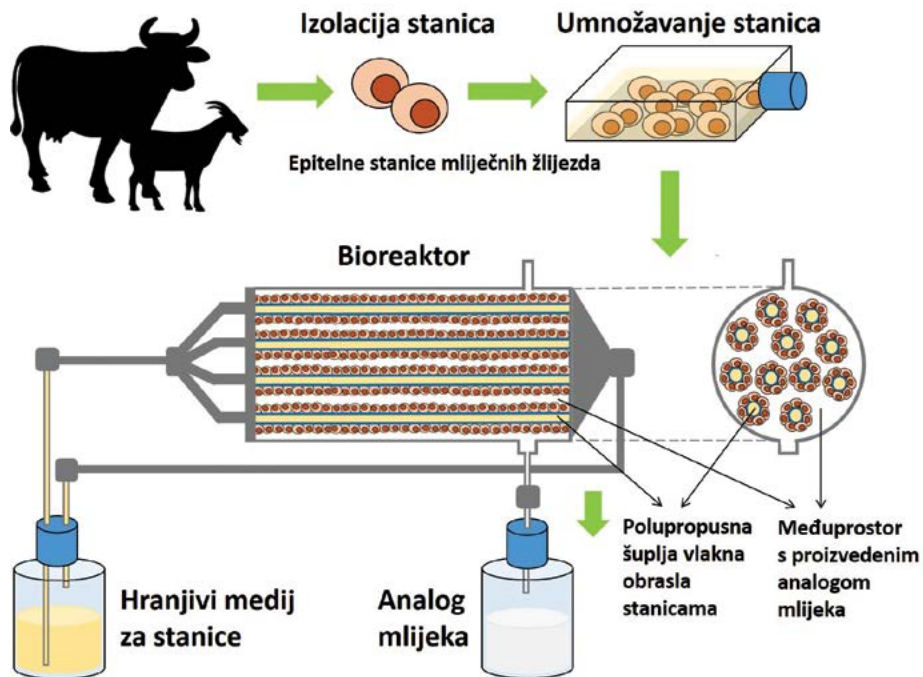
zvod ima i nedostataka. Analiza kultiviranog mesa pokazala je da mišićna vlakna ne nalikuju prirodnim jer su slabije razvijena i nejednako ispružena. Također, moguć je manjak nekih nutritivno bitnih sastojaka koji se prirodno ne proizvode u mišićnom tkivu poput kreatina ili taurina (Fraeye i sur., 2020.). Što se tiče konzistencije i okusa, postoje još neke manjkavosti koje bi se mogle izbjeći primjenom *in vitro* proizvedenih kosti i krvi, budući da tehnike proizvodnje ta dva tkiva već postoje (Piroso i sur., 2018., Zhou i sur. 2020.). Činjenica s kojom se zasad slažu svi stručnjaci je da se identična kombinacija sastava, okusa i hranjivosti „prirodnog“ mesa vjerojatno nikad neće moći stvoriti *in vitro*. Ako je to doista tako i k tome manje relevantno u odnosu na mantru o potrebi za održivom opskrbom čovječanstva nutrijentima životinjskog porijekla, čemu onda sav uloženi trud u složene *in vitro* postupke? Možda bi jednostavnije bilo proizvesti životinjske proteine standardnim fermentacijskim tehnologijama pomoću mikroba (Fraeye i sur., 2020.).

Proizvodnja *in vitro* nadomjestaka mlijeka

Zbog promjenjenog načina ishrane, stručnjaci predviđaju da će se do 2050. potrošnja mlijeka i mliječnih prerađevina u svijetu udvostručiti u odnosu na 2000. godinu. Međutim, slično kao i kod uzgoja životinja radi mesa, stočarstvo usmjereno prema proizvodnji mlijeka sve se više promatra kroz prizmu neodrživosti. Razlozi su prije svega ekološki. U ekonomskom smislu, mlijeko je jako osjetljiv proizvod jer nastaje prirodnim procesom na koji ne može utjecati tržišna cijena. Drugim riječima, unatoč povremenoj neprofitabilnosti, životinje svakodnevno proizvode mlijeko, koje farmer mora na neki način zbrinjavati (Guzmán-Luna i sur., 2021.). Zbog navedenih razloga, ali i tehnika koje pruža suvremena biotehnologija, raste zanimanje za razvoj postupka dobivanja „mlijeka bez krava“. Proizvodnja mlijeka u mliječnim žlijezdama je elegantno uređen proces koji pretvara nutrijente iz majčinog organizma u hranu za dojenče. Unatoč razlikama u količini i sastavu mlijeka među sisavcima, fiziološki put njegova nastanka je vrlo ujednačen. Tijekom graviditeta stanice za proizvodnju mlijeka, nazvane epitelne stanice mliječnih žlijezda (ESMŽ), počinju se ubrzano umnožavati. Nakon poroda, biokemijski signali u majčinoj krvi daju znak za početak laktacije, tj. proizvodnju i lučenje mlijeka. Kulture EMSŽ koriste se već desetljećima u znanstvene svrhe za istraživanje lijekova i fiziolo-

logije (Tsugami i sur., 2020.; Sumbal i sur., 2021.) Do danas su uspostavljene primarne kulture ESMŽ svih za mliječnu industriju značajnih vrsta te čovjeka (Xu i sur., 2021.). Tvrtka BioMilk iz Izraela razvija tehnologiju korištenjem ESMŽ uzetih biopsijom iz vimena krava, koza, ovaca i deva, dok stručnjaci američko-singapurske tvrtke *TurtleTree* koriste životinjske MS koje u kulturi *in vitro* diferencijaciju u ESMŽ. Na razvoju proizvodnje ljudskog mlijeka specijalizirale su se tvrtke *Wilk* i *BiomilQ*. U ovom slučaju stanice odvojene od epitela tijekom dojenja prikupljaju se iz mlijeka, ili se izoliraju iz tkiva nakon kirurških zahvata smanjenja grudi.

Nakon izolacije i umnožavanja ESMŽ, te neophodnog koraka diferencijacije ako se koriste MS, kultura stanica se postavlja u bioreaktor gdje započinje proizvodnja mlijeka (Slika 3). Pritom se hranjivi medij za uzgoj stanica obogaćuje signalnim molekulama koje potiču staničnu proliferaciju te sintezu komponenti mlijeka. Od signalnih molekula koristi se hidrokortizon te rekombinantno dobiveni inzulin, epidermalni čimbenik rasta i prolaktin. S obzirom da se proizvod, tj. mlijeko izlučuje iz ESMŽ, ne smije se dozvoliti njegovo miješanje s hranjivim medijem. Zbog toga tvrtka *BiomilQ* koristi specifični tip bioreaktora tzv. membranski bioreaktor sa šupljim vlaknima (Gaurina Srček i sur., 2016.). On se sastoji od snopa kapilara kroz koje protječe hranjivi medij, a oko kojih konfluentno rastu ESMŽ. Stijenke kapilara su mikroporozne i kao takve selektivno propuštaju hranjive tvari stanicama. U prostor između ESMŽ nakuplja se proizvedeno mlijeko koje se postupno izdvaja iz bioreaktora. Ovako dobiven proizvod sadrži skoro prirodnu količinu beta-kazeina, triglicerida te laktoze i niza oligosaharida. Također, u njemu se nalaze složene micelarne strukture koje ne mogu nastati bez stanica te ih stoga nema u uobičajenim dojenačkim pripravcima (formule) (Ambrožej i sur., 2021.). Nedavne analize pokazale su da analog mlijeka nastao *in vitro* ipak ne sadrži baš sve sastojke prirodnog mlijeka čiji se sastav ionako mijenja tijekom razdoblja laktacije (Boutinaud, i sur., 2015.). Primjerice u njemu je manjak nekih proteina, nema majčinih imunoglobulina ni mikrobiote, međutim naknadna suplementacija proizvoda do poželjnog sastava u tehnološkom smislu ponekad je prednost. S obzirom da se radi o acelularnom proizvodu, postoji manje regulatornih prepreka da se genetičkim inženjerstvom modificiraju stanice u smjeru poboljšanja sastava mlijeka. Pojačavanje ili stišavanje ekspresije



Slika 3. Pregled postupka proizvodnje nadomjestka mlijeka pomoću životinjskih stanica
Figure 3 Production process of milk analogue with animal cells

određenih gena u kulturi ESMŽ može promijeniti udio laktoze i nekih proteina (Zhang i sur., 2020.). Novim prilagođenim sastavom proizvoda moguće je povoljno utjecati na njegovu hranjivost i učinak na zdravlje potrošača (Carr i sur., 2021.). Tvrtke koje razvijaju tehnologiju ističu da će za početak svoje proizvode promovirati kao nadomjestak majčinog mlijeka, primjerice za dojenčad koja je usvojena ili koje majke iz medicinskih razloga ne mogu dobiti. Ovisno o uspjehu na tržištu, planira se širenje palete proizvoda na fermentirane prerađevine poput sira i jogurta. U svakom slučaju, nazivanje nastalih analoga vrlo će vjerojatno biti ograničeno pravilima regulatornih institucija kao što je to u SAD i EU provedeno za napitke na bazi biljaka poput soje i badema.

Zaključak

Novе tehnologije donose nove navike, mijenjaju običaje i zato su oduvijek dijelile javnost na zagovornike i protivnike. Poljoprivredu, kao primarnu gospodarsku djelatnost, napredak nikad nije zaobilazio, naročito u posljednjih stotinjak godina, počevši od uvođenja mehanizacije pa do tzv. GMO proizvoda. Najvažnija uloga poljoprivrede je proizvodnja hrane, našeg biološkog goriva. To je tvar koju unosimo u tijelo, ne samo da bismo živje-

li, nego da bismo u njoj uživali. Kad u nešto tako osobno zadire većini javnosti nejasna moć tehnologije, postaju razumljivi proboji straha i otpora. Javnost stoga ne treba podcjenjivati, već je, osluškujući joj stavove, educirati i s njom komunicirati, te joj dati podlogu i vremena za donošenje odluke. Međutim prema FAO, čini se da vremena baš i nema. Do 2050. bit će nas skoro deset milijardi, te ako ne promijenimo načine proizvodnje i distribucije hrane, ekosustavi kakve znamo mogli bi nepovratno nestati.

Na prihvaćanje novih tehnologija, pored društvenih, utječu i ekonomski parametri. Razvoj proizvodnje nadomjestaka mesa i mlijeka *in vitro* logičan je civilizacijski doseg temeljen na potencijalima postojećih tehnologija. Tvrtke koje se njime bave trenutno koriste relativno male proizvodne sustave. S obzirom da većina tih tvrtki još nema dozvolu za stavljanje proizvoda u široku potrošnju, dobrim dijelom oslanjaju se na financijske potpore i ulaganja. Modeli temeljeni na njihovim tehnološkim bilancama i tzv. analize životnog ciklusa proizvoda ukazuju na dugoročnu održivost i isplativost postupaka kojima se koriste (*Good Food Institute*, www.gfi.org). Dodatna prednost *in vitro* tehnologije je i neuvjetovanost proizvodnje geografskim podnebljem. Štoviše, preporučuje se za dobivanje hrane na našim budućim putovanjima u svemir. Očito je

da vizija postoji, no put do uspjeha još je dug i neizvjestan. Uvjete koje na tom putu valja zadovoljiti opširno su opisani u recentnom preglednom radu Chriki i Hocquett (2020.). Autori ističu da postupci *in vitro* proizvodnje hrane moraju postati učinkoviti, pouzdani te laki za provođenje, a preneseni u veće mjerilo (engl. *scale-up*) jednako provedivi i isplativi. Učinak *in vitro* postupaka na okoliš mora biti manje štetan od učinka kojeg imaju trenutno prevladavajući proizvodni postupci. Proizvodi dobiveni svakom novom tehnologijom moraju zadovoljiti regulatorne norme zdravstvene ispravnosti. Konačno, no ne manje bitno, potrošači, uvjereni u sigurnost i prednosti nove tehnologije hrane, moraju pokazati spremnost za prihvaćanje njenih proizvoda. Činjenica je da nadomjestci mesa i mlijeka

proizvedeni kulturom životinjskih stanica imaju žestoku konkurenciju u analogima biljnog porijekla, a pored toga kod dijela potrošača prisutan je zazor od tzv. neprirodne hrane. To će dodatno teretiti proizvođače da pored troškova razvoja nove tehnologije i promociju proizvoda iste, ulažu i u istraživanje, te potencijalno mijenjanje, prehrambenih navika društva. Iz tog se razloga u posljednjih pet godina, globalno ulaganje u tehnologiju kultiviranog mesa ušeseterostručilo i 2021. je iznosilo preko jedne milijarde eura. Međutim, kako navodi jedan od skeptika: za uspjeh nove ideje, više od nadanja potrebna je dobra i transparentna znanost (Fassler, 2021.). Bilo bi doista zabrinjavajuće da u nizu izazova planetarnih razmjera u pozadini svega biva samo utrka za patentima i brzom zaradom. Vrijeme će pokazati.

Literatura

- [1] Ambrožej, D., K. Dumycz, P. Dziechciarz, M. Ruszczynski (2021): Milk fat globule membrane supplementation in children: systematic review with meta-analysis. *Nutrients* 13 (3), 714. <https://doi.org/10.3390/nu13030714>.
- [2] Ben-Arye, T., Y. Shandalov, S. Ben-Shaul, S. et al. (2020): Textured soy protein scaffolds enable the generation of three-dimensional bovine skeletal muscle tissue for cell-based meat. *Nat Food* 1, 210–220. <https://doi.org/10.1038/s43016-020-0046-5>.
- [3] Boutinaud, M., L. Herve, V. Lollivier (2015): Mammary epithelial cells isolated from milk are a valuable, non-invasive source of mammary transcripts. *Front Genet* 6, article 323. doi:10.3389/fgene.2015.00323.
- [4] Carr, L., E. Virmani, D. Misty, F. Rosa, D. Munblit, K. Matzela, A. A. Elolimy, L. Laxmi (2021): Role of human milk bioactives on infants' gut and immune health. *Front Immunol* 12, article 604080. doi:10.3389/fimmu.2021.604080.
- [5] Chauve, M., S. Foucher, S. Galinat, G. Pireau (2017): Improved production of vanillin by fermentation. *PCT Application*, WO2017/025339.
- [6] Chriki, S., J. F. Hocquette (2020): The Myth of Cultured Meat: A Review. *Front Nutr* 7, 7. doi:10.3389/fnut.2020.00007.
- [7] Diwan, D., M. Sharma, M. Tabatabaei, V. K. Gupta (2021): Ovalbumin production without poultry. *Nat Food* 2, 924–925. <https://doi.org/10.1038/s43016-021-00438-y>.
- [8] Eibl, R., P. Meier, I. Stutz, D. Schildberger, T. Hühn, D. Eibl (2018): Plant cell culture technology in the cosmetics and food industries: current state and future trends. *Appl Microbiol Biotechnol* 102, 8661–8675. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-018-9279-8>.
- [9] Fish, K. D., N. R. Rubio, A. J. Stout, J. S. K. Yuen, D. L. Kaplan (2020): Prospects and challenges for cell-cultured fat as a novel food ingredient. *Trends Food Sci Technol* 98, 53–67. doi: 10.1016/j.tifs.2020.02.005.
- [10] Fassler, J. (2021) Lab-grown meat is supposed to be inevitable. The science tells a different story. *The Counter* <https://thecounter.org/lab-grown-cultivated-meat-cost-at-scale/>
- [11] Fraeye, I., M. Kratka, H. Vandeburgh, L. Thorrez (2020): Sensorial and nutritional aspects of cultured meat in comparison to traditional meat: much to be inferred. *Front.Nutr* 7, article 35. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.00035>.
- [12] Foley, J., N. Ramankutty, K. Brauman et al. (2011): Solutions for a cultivated planet. *Nature* 478, 337–342. <https://doi.org/10.1038/nature10452>.
- [13] Gaurina Srček, V., K. Radošević, S. Jukić, Slivac (2016): Bioreaktori za uzgoj kultura životinjskih stanica. *Hrv čas prehr tehnol biotehnol nutr* 11 (1-2), 18–27. <https://hrcak.srce.hr/166768>.
- [14] Georgiev, V., A. Slavov, I. Vasileva, A. Pavlov (2018): Plant cell culture as emerging technology for production of active cosmetic ingredients. *Engin Life Sci* 18 (11), 779–798. <http://dx.doi.org/10.1002/elsc.201800066>.
- [15] Guan, X., Q. Lei, Q. Yan, X. Li, J. Zhou, G. Du, J. Chen (2021): Trends and ideas in technology, regulation and public acceptance of cultured meat. *Future Foods* 3, 100032. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2021.100032>.
- [16] Guzmán-Luna, P., M. Mauricio-Iglesias, A. Flysjö, A. Hospido (2021): Analysing the interaction between the dairy sector and climate change from a life cycle perspective: A review. *Trends Food Sci Technol* <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.09.001>.
- [17] Holt, G. A., G. McIntyre, D. Flagg, E. Bayer, J. D. Wanjura, J. D. Pelletier (2012): Fungal mycelium and cotton plant materials in the manufacture of biodegradable molded packaging material: evaluation study of select blends of cotton byproducts. *J Biobased Mater Bioenergy* 6 (4), 431–439. <http://dx.doi.org/10.1166/jbmb.2012.1241>.
- [18] Kasper, H., B. Etske (2022): Can recombinant milk proteins replace those produced by animals? *Curr Opin Biotech* 75, 102690. doi:10.1016/j.copbio.2022.102690.
- [19] Khodabukus, A., L. Madden, N.K. Prabhu, T. R. Koves, C. P. Jackmann, D. M. Muoio, N. Bursac (2019): Electrical stimulation increases hypertrophy and metabolic flux in tissue-engineered human skeletal muscle. *Biomaterials* 198, 259–269. doi:10.1016/j.biomaterials.2018.08.058.
- [20] Kyle, D., N. R. Fish, R. Rubio, A. J. Stout, J. S. K. Yuen, D. L. Kaplan (2020): Prospects and challenges for cell-cultured fat as a novel food ingredient. *Trends Food Sci Technol* 98, 53–67. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.02.005>.

- [21] Manyi-Loh, C., S. Mamphweli, E. Meyer, A. Okoh (2018): Antibiotic use in agriculture and its consequential resistance in environmental sources: potential public health implications. *Molecules* 23, 795. doi: 10.3390/molecules23040795.
- [22] Mohammadi, P., A. S. Aranko, C. P. Landowski, O. Ikkala, K. Jaudzems, W. Wagermaier, M. T. Linder (2019): Biomimetic composites with enhanced toughening using silk inspired triblock proteins and aligned nanocellulose reinforcements. *Sci Adv* 19, 5 eaaw2541. <http://dx.doi.org/10.26434/chemrxiv.8108105.v1>.
- [23] Papp, N., K. Rudolf, T. Bencsik, D. Czegeyi (2017): Ethnomycological use of *Fomes fomentarius* (L.) Fr. and *Piptoporus betulinus* (Bull.) P. Karst. in Transylvania, Romania. *Gen. Res Crop Evol* 64, 101-111. <http://dx.doi.org/10.1007/s10722-015-0335-2>.
- [24] Piroso, A., R. Gottardi, P. G. Alexander, R. S. Tuan (2018): Engineering in-vitro stem cell-based vascularized bone models for drug screening and predictive toxicology. *Stem Cell Res Ther* 9, 112. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0847-8>.
- [25] Post, M. J., S. Levenberg, D. L. Kaplan, N. Genovese, J. Fu, C. J. Bryant, N. Negowetti, K. Verzijden, P. Moutsatsou (2020): Scientific, sustainability and regulatory challenges of cultured meat. *Nat Food* 1, 403-415. <https://doi.org/10.1016/j.natfo.2021.100032>.
- [26] Ritchie, H., M. Roser (2017): Meat and dairy production. *Our world in data*, 1-35. <https://ourworldindata.org/meat-production>.
- [27] Springmann, M., M. Clark, D. Mason-D'Croz, K. Wiebe, B. L. Bodirsky, L. Lassalle, V. De Vries, S. J. Vermeulen, M. Herrero, K. M. Carlson et al. (2018): Options for keeping the food system within environmental limits. *Nature* 562, 519-525. <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-018-0594-0>.
- [28] Sumbal, J., A. Chiche, E. Charifou, Z. Koledova, H. Li (2020): Primary mammary organoid model of lactation and involution *Front Cell Dev Biol* 8, article 68. doi:10.3389/fcell.2020.00068.
- [29] Tuomisto, H. L. (2019): The eco-friendly burger: Could cultured meat improve the environmental sustainability of meat products? *EMBO Rep* 20: e47395. doi:10.15252/embr.201847395.
- [30] Tsugami, Y., N. Suzuki, M. Kawahara, T. Suzuki, T. Nishimura, K. Kobayashi (2020): Establishment of an in vitro culture model to study milk production and the blood-milk barrier with bovine mammary epithelial cells. *Anim Sci J* 91, e13355. doi:10.1111/asj.13355.
- [31] Van Eenennaam, A. L., S. J. Werth (2021): Animal board invited review: Animal agriculture and alternative meats – learning from past science communication failures. *Animal* 15, 100360. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100360>.
- [32] Verma, A., M. Verma, A. Singh (2020): Animal tissue culture principles and applications. In: *Animal Biotechnology*. Academic Press, Oxford, (269-293). doi:10.1016/B978-0-12-811710-1.00012-4.
- [33] Wang, J., J. Tavakoli, T. Youhong (2019): Bacterial cellulose production, properties and applications with different culture methods – A review. *Carbohydr Polym* 219, 63-76. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.05.008>.
- [34] Xu, P., H. Fotina, T. Fotina, S. Wang (2021): In vitro culture and evaluation of bovine mammary epithelial cells from Ukraine dairy cows. *Iran. J Vet Res* 22 (1), 65-71. doi:10.1111/asj.13355.
- [35] Zhang, H., T. Liu, B. Li, K. Zhang, D. Wang, Y. Liu, L. Ge, Y. Jiang, F. Su (2020): Establishment of a stable β -casein protein-secreted Laoshan dairy goat mammary epithelial cell line. *Front Vet Sci* 7, article 501. doi:10.3389/fvets.2020.00501.
- [36] Zhou, P., M. Ouchari M, Y. Xue Y, Q. Yin (2020): In vitro generation of red blood cells from stem cell and targeted therapy. *Cell Transplant* 29, 1-5. doi:10.1177/0963689720946658.

Dostavljeno: 28.04.2022.

Prihvaćeno: 26.05.2022.

Trends in Cell-based Production of Meat and Milk Analogues

Abstract

Increasing population means increased global food demand. Therefore we are facing a great challenge in harmonizing the production of food with the need to reduce adverse environmental impacts of expanding agriculture. The problem could be solved by adopting a new field in biotechnology known as cellular agriculture. This agriculture can provide alternative manufacturing systems for many animal and plant-based products. The products mimicking meat and milk, are a major target of a growing number of start-up companies worldwide. These companies develop their technology relying on know-how from tissue engineering and animal cell bioprocessing. Here we present an overview of the cell culture-based technologies for *in vitro* meat and milk analogues production. We also discuss the quality of the products as well as the production requirements and sustainability.

Key words: cellular agriculture, biotechnology, cultured meat, milk analogue

Trends in der zellbasierten Produktion von Fleisch- und Milchanaloga

Zusammenfassung

Eine wachsende Bevölkerung bedeutet eine steigende weltweite Nachfrage nach Nahrungsmitteln. Daher stehen wir vor der großen Herausforderung, die Produktion von Nahrungsmitteln mit der

Notwendigkeit in Einklang zu bringen, die negativen Auswirkungen der expandierenden Landwirtschaft auf die Umwelt zu reduzieren. Das Problem könnte durch die Einführung eines neuen Zweigs der Biotechnologie, der sogenannten zellulären Landwirtschaft, gelöst werden. Diese Landwirtschaft bietet alternative Herstellungssysteme für viele tierische und pflanzliche Produkte, die heutzutage in der Viehzucht und Landwirtschaft hergestellt werden. Fleisch und Milch sind zwei solcher Produkte; die Herstellung von deren Ersatzprodukten anhand der zellulären Landwirtschaft ist ein wichtiges Ziel zahlreicher Unternehmen weltweit. Diese Unternehmen entwickeln ihre Technologie auf der Grundlage des Know-hows aus dem Tissue Engineering und der Bioprozessierung von tierischen Zellen. Hier geben wir einen Überblick über die zellkulturbasierten Technologien für die In-vitro-Produktion von Fleisch- und Milchanaloga. Wir erörtern auch die Qualität der Produkte und die Nachhaltigkeit der Produktion.

Schlüsselwörter: zelluläre Landwirtschaft, Biotechnologie, kultiviertes Fleisch, Milchersatz

Los logros en la producción de sustitutos de carne y leche basada en células

Resumen

El aumento de la población conduce a una mayor demanda de alimentos. Por eso es muy importante abordar la armonización del aumento de la producción de alimentos con la reducción del impacto nocivo sobre el medio ambiente que tiene la expansión global de la agricultura. Una nueva área de la biotecnología, llamada agricultura celular, podría ayudar a abordar este problema. La agricultura celular ofrece diferentes sistemas de producción para muchos productos de origen animal y vegetal que se obtienen hoy en día por la ganadería o la agricultura. La carne y la leche son dos de esos productos, y la producción de sus sustitutos mediante agricultura celular es el objetivo de un número creciente de empresas en todo el mundo. Desarrollan tecnología basada en la experiencia adquirida en ingeniería de tejidos y bioprocesos de células animales. En este artículo presentamos una descripción general de las nuevas tecnologías basadas en la cultivación de los cultivos celulares para obtener *in vitro* la llamada carne cultivada y los análogos de leche. También discutimos la calidad de estos productos y la sostenibilidad de su producción.

Palabras claves: agricultura celular, biotecnología, carne cultivada, sustitutos de leche

Progressi nella produzione dei succedanei della carne e del latte con l'aiuto dell'agricoltura cellulare

Riassunto

L'aumento della popolazione mondiale porta inevitabilmente ad un aumento della domanda alimentare. Ecco perché è molto importante accompagnare l'aumento della produzione alimentare mondiale con la riduzione dell'impatto nocivo sull'ambiente che l'espansione globale dell'agricoltura comporta. Una nuova area della biotecnologia, chiamata agricoltura cellulare, potrebbe aiutare a risolvere questo problema. L'agricoltura cellulare offre diversi sistemi di produzione per molti prodotti di origine animale e vegetale che oggi si ottengono dall'allevamento o dall'agricoltura tradizionali. La carne e il latte sono due di questi prodotti, e la produzione dei loro analoghi mediante l'agricoltura cellulare è l'obiettivo di un numero crescente di aziende in tutto il mondo. I loro sforzi si concentrano intorno allo sviluppo di una tecnologia basata sull'esperienza acquisita nell'ingegneria tissutale e nei processi cellulari animali. In questo articolo presentiamo una panoramica delle nuove tecnologie basate sull'agricoltura cellulare funzionali alla produzione degli analoghi della carne e del latte coltivati *in vitro*. Discutiamo anche della qualità di questi prodotti e della sostenibilità della loro produzione.

Parole chiave: agricoltura cellulare, biotecnologia, carne coltivata, succedaneo del latte