

Yapay et üretimi ve gelecek vizyonu

Darya FARHOOMAND¹, Aybüke OKAY^{1,2}, E. Sümer ARAS¹, İlker BÜYÜK¹

Cite this article as:

Farhoomand, D., Okay, A., Aras, E.S., Büyük, İ. (2022). Yapay et üretimi ve gelecek vizyonu. *Food and Health*, 8(3), 260-272.

<https://doi.org/10.3153/FH22024>

¹ Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi,
Biyoloji Bölümü, 06560, Ankara,
Türkiye

² Hacettepe Üniversitesi, Aşı Enstitüsü,
Aşı Teknolojisi Anabilim Dalı, 06100,
Ankara, Türkiye

ORCID IDs of the authors:

D.F. 0000-0002-7731-648X

A.O. 0000-0002-6772-4316

E.S.A. 0000-0003-3474-9493

İ.B. 0000-0002-0843-8299

Submitted: 27.10.2021

Revision requested: 18.02.2022

Last revision received: 22.02.2021

Accepted: 25.02.2022

Published online: 19.06.2022

Correspondence: İlker BÜYÜK

E-mail: buyuki@ankara.edu.tr



© 2022 The Author(s)

Available online at
<http://jfh.sscientificwebjournals.com>



ÖZ

Yapay et gelecekteki gıda üretiminde kullanılmak üzere bir yöntem olarak büyük umut vadetmektedir. Geleneksel etin, artan insan nüfusu ile birlikte yetersiz kalacağı ön görülmektedir. Ayrıca yapay etin geleneksel ete kıyasla çevre için sürdürülebilir olması, kontrollü yağ içeriği, antibiyotik ve hormon içermemesi gibi insan sağlığı açısından pek çok avantajı bulunmaktadır. Kültürleşmiş et olarak da bilinen yapay et, kas dokusu bazlı protein ürünleri, kök hücre kültürü ve farklılaşmasını içeren *in vitro* miyogenez, lezzet ve doku için ise olgun kas hücresi işleme yoluyla üretilmektedir. Yapay et üretimi sıralı bir süreçten oluşmaktadır. İlk olarak kök hücre toplama için kas örnekleme ve sırasıyla kas dokusu ayrışması ve kas kök hücre izolasyonu, birincil hücre kültürü, yüksek hücre kültürü, kas farklılaşması ve olgunlaşma ile son bulmaktadır. Sürecin olumlu ve olumsuz yanlarıyla birlikte derinlemesine anlaşılması, yalnızca yapay et üretimine değil, aynı zamanda gıda endüstrisi için yeni biyomalzemeler arayan iş sektörlerine de yardımcı olacaktır. Bu derleme, yapay et üretimi için kullanılan yöntemleri tartışarak hem hücresel tarımın yeni çağına hazırlanmak hem de akademi ve endüstride kullanılmak üzere hazırlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Yapay et, Kas kök hücreleri, Biyoreaktör, Biyosensör

ABSTRACT

Artificial meat production and future vision

Artificial meat shows great promise as a method for use in future food production. It is predicted that traditional meat will be insufficient with the increasing human population. In addition, artificial meat has many advantages in terms of human health, such as being sustainable for the environment, controlled fat content, and absence of antibiotics and hormones compared to traditional meat. Artificial meat, also known as cultured meat, is produced through *in vitro* myogenesis, which includes muscle tissue-based protein products, stem cell culture, and differentiation, and mature muscle cell processing for flavor and texture. Artificial meat production consists of a sequential process; firstly muscle sampling for stem cell collection and followed by muscle tissue dissociation and muscle stem cell isolation, primary cell culture, high cell culture, and ending with muscle differentiation and maturation. A deep understanding of the process by considering its pros and cons will help not only artificial meat production but also the food industry in business sectors seeking new biomaterials. By explaining the methods utilized for artificial meat production, this study is created to prepare for the new era of cellular agriculture as well as for application in academia and industry.

Keywords: Artificial meat, Muscle stem cells, Bioreactor, Biosensor

Giriş

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) verilerine göre 2050 yılına gelindiğinde mevcut gıda sistemlerinden %70 daha fazla gıda talebi olacağı ortaya konmuştur (Djissalov ve ark., 2021). Ek olarak yaşanan iklim krizi gıda yetersizliğini olumsuz yönde tetiklemektedir (Agovino ve ark., 2019). Et ise antik çağlardan beri insanlık için değerli bir tam protein kaynağı olmuştur (Pereira ve Vicente, 2013). Ancak hem gelecek yıllar için duyulan endişeler hem de küresel et tüketimi giderek artmaktadır (Steinfeld ve ark., 2006). Bu nedenle gıda ihtiyacını karşılamak üzere alternatif yollar irdelenmeye başlanmıştır. Bunların başında yapay et gelmektedir. Son yıllarda yapay et, geleneksel ete rekabetçi ve sürdürülebilir bir alternatif olarak hızla ivme kazanmıştır (Sha ve Xiong, 2020). Yapay et, çevresel yük ve hayvan refahı ile ilgili pek çok konuda geleneksel ete kıyasla avantajlar sağlamaktadır (Post, 2012). Yapay et veya 'hücre bazlı et' olarak da bilinen bu yeni et ve protein ürünleri, geleneksel et endüstrisinin karşılaştığı sorunları gidermek için tasarlanmış çığır açan teknolojilerden yararlanmaktadır (Bonny ve ark., 2015). Yapay et, geleneksel et üretimine kıyasla çok daha az sera gazı emisyonuna, su, toprak ve düşük enerji kullanımına sahiptir (Tuomisto ve Mattos, 2011, Alexander ve ark., 2017). Çünkü hayvan eti üretimi, sera gazı (GHG) emisyonu, arazi kullanımı, su ve enerji tüketiminin önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. Hayvansal tarımdan kaynaklanan en önemli sera gazları metan ve azot oksittir. Karbon dioksit, metan ve azot oksit olmak üzere üç ana sera gazının, çiftlik hayvanlarının

toplam emisyonlarına etkisi sırasıyla %9, %39 ve %65'tir. Ayrıca, et talebinde öngörülen önemli artışla birlikte, ekilebilir arazilerin büyük bir kısmının zaten hayvan besleme ve yönetimine ayrılmış olması insan beslenmesi açısından üretim kapasitesini hızla tüketmektedir. Kaldı ki artan dünya nüfusu ve gelişmekte olan ekonomiler doğrultusunda et tüketiminin önümüzdeki kırk yılda iki katına çıkacağı tahmin edilmektedir (Steinfeld ve ark., 2006). Günümüzde ise geleneksel et üretim kapasitesinin hata payları ile birlikte zaten maksimuma yakın olduğu görülmektedir (McLeod, 2011). Ek olarak geleneksel hayvancılığa dayalı et üretimi pek çok olumsuz sonuçları doğurmaktadır bu nedenle sürdürülebilir ve daha güvenli gıda üretimi yöntemlerine odaklanılması kaçınılmaz olmuştur (Sexton ve ark., 2019; Ismail ve ark., 2020; Rischer ve ark., 2020). Örneğin halihazırda devam eden SARS-CoV-2 virüsü H5N1 ve H7N9 kuş gribi gibi diğer zoonotik virüsler hayvan yetiştiriciliği açısından son derece tehlike arz etmektedir (Anomaly, 2020; Verhagen ve ark., 2021). Aynı zamanda laboratuvar ortamında yetiştirilen bir et üreticiler tarafından tamamen kontrol edilerek kesim esnasında potansiyel bir kontaminasyondan korunmuş olur. Çünkü *E. coli*, *Salmonella* ve *Campylobacter* gibi bağırsak patojenleriyle karşılaşma riskine sahip değildir (Derossi ve ark., 2021). Ayrıca özellikle son 20 yılda çiftlik hayvanlarında artan antimikrobiyal direnç (AMR) pek çok soruna yol açmaktadır (Van Boeckel ve ark., 2019). Geleneksel etin dezavantajları Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Geleneksel etin dezavantajları (Bhat ve ark., 2015; Bonny ve ark., 2015; Joshi ve Kumar, 2015; Kumar ve ark., 2017; Van Eenennaam, 2017; Gaydhane ve ark., 2018)

Table 1. Disadvantages of traditional meat (Bhat ve ark., 2015; Bonny ve ark., 2015; Joshi ve Kumar, 2015; Kumar ve ark., 2017; Van Eenennaam, 2017; Gaydhane ve ark., 2018)

| | |
|---|---|
| Hayvanların kesimi | DSÖ'ye göre, 1997-1999 yılları arasında dünya genelinde kişi başına et tüketimi yılda 36,4 kg iken, 2030 yılına kadar yılda 45,3 kg'a yükselecektir (Vasileska ve Rechkoska, 2012). |
| Kaynak kullanımı | Arazi yüzeyinin yaklaşık %30'u hayvancılık üretimi için küresel olarak kullanılmaktadır. Tatlı su tüketiminin yaklaşık %70'i ve et ve gıda üretimi için kullanılmaktadır. |
| Küresel ısınma ve kirlilik | Hayvancılık sektörü, dünya çapında atmosfere verilen antropojenik sera gazı emisyonlarının %18'ine ve antropojenik metan emisyonlarının %37'sine katkıda bulunmaktadır. |
| Yetersiz besin dönüşümü | 1 kg kümes hayvanları, domuz eti ve sığır eti sırasıyla 2, 4 ve 7 kg tahıl gerektirdiğinden, geleneksel et üretim sistemleri besin dönüşümünde verimli değildir. |
| Hastalıklar ve sağlık endişeleri | İnsanlar, bağışıklığı baskılanmış, kirletici maddeler içeren hayvanlardan salınan patojen tarafından riske atılır. |
| Dini kısıtlamalar ve sosyal tabular | Geleneksel kesim sistemi ile bazı ciddi dini uygulamaların takip edilmesi gerekmektedir. |
| Nesli tükenmekte olan türlerin neslinin tükenmesi | Hayvancılık ve çiftçilikten kaynaklanan ormansızlaşma nedeniyle, hayvan türlerinin çoğu doğal yaşam alanları kaybedilmekte ve nesli tükenmektedir. |

Yapay et üretiminde ise son gelişmeler ile birlikte antibiyotik kullanılmadan ve serumsuz ortamlarda uygulanabilen biyoprosesler hem sağlık açısından hem de maliyet açısından olumlu bir etki olarak görülmektedir (Specht ve Scientist, 2020). Nitekim yapay et sayesinde kirleticilerin, antibiyotiklerin yokluğu, kontrollü yağ kullanımı ve özellikle gıda kaynaklı hastalıkların insidans oranlarındaki düşüşün, obezite ve kardiyovasküler hastalıkların azalması açısından gelecek yıllarda insan sağlığına olumlu katkıda bulunması beklenmektedir (Fox ve ark., 2011; Mattick, 2018). Ayrıca hayvan refahı ile ilgili artan endişeler, giderek tüketici davranışını etkilemektedir ve bu nedenle et endüstrisi bu endişeyi göz önünde bulundurarak uygulamalarını değiştirmeye yönelik sahalara araştırmaktadır. Özetle, hayvan eti üretiminin yükünü ve baskısını hafifletmek üzere alternatifleri araştırmak için çok sayıda ve acil neden vardır. Şu anda çalışmalar geleceğin gıdası olarak görülen yapay et üretiminde tedarik zincirinin tamamen güvenilir olması yönünde hızla ilerlemektedir. Bu yüzden hassas ve spesifik analitik cihazların geliştirilmesiyle birlikte gıda güvenliğinin izlenmesini sağlayacak sensörlerin kullanılması bir ihtiyaç haline gelmiştir. Tüm bu gelişmiş izleme seçenekleri çalışmaların optimize edilmesi ve dolayısıyla güvenli hale gelmesine yardımcı olacaktır (Ong ve ark., 2020). Bu işlemin temeli ise, hayvan kaslarının karmaşık yapısını birkaç hücre ile yeniden oluşturmaya dayanmaktadır. Ancak bir et alternatifinin kabul edilmesi ve sanayileşmesi için iki temel koşul yani taklit ve verimlilik göz önünde bulundurulmalıdır. Yeni bir et ikamesinin geniş çapta benimsenmesi için geleneksel ete benzeyen görsel görünüm, koku, doku ve tat gibi tüm fiziksel duyuların tam olarak taklit edilmesi yahut daha da iyisinin yeniden oluşturulması gerekmektedir (Bredahl ve ark., 1998; Verbeke ve ark., 2010). Yapay et üretimi için sayılan başlıca engeller olarak; tüketicilerin kabulü ve henüz öngörülemeyen riskler kaygısı gelmektedir. Tüketiciler tarafından tercih edilmeme sebepleri arasında ise, etik kaygılar ve doğal bir ürün olarak kabul edilmeme yapay et üretim sisteminin gelişmesini ve ticarileşmesini engelleyebilecek bazı faktörler arasındadır (Sürek ve Pınar, 2020). Bu derleme ile yapay et üretiminin mevcut durumunu, düzenlemelerini, toplumsal yönlerini, ölçeklendirme ve ticarileştirmeyi ayrıca mevcut multidisipliner yöntemleri, biyoreaktör uygulamaları ve görüntüleme tekniklerine yönelik yaklaşımları ele almaktayız.

Yapay Et

Yapay et fikri yakın zamanda daha çok gündeme gelse de aslında ortaya çıkışı 1912'lere dayanmaktadır. Günümüze geldiğinde ise dünyada çok sayıda yapay et şirketleri kurulmuştur. Örneğin, ABD'de Memphis Meat firması hayvan hücrelerinden dana, tavuk ve ördek eti üretmeyi başarmıştır. Rus Deneysel Veterinerlik Enstitüsü ise 2017'de ilk yapay eti

üretmeyi başarmıştır. Bir ay içinde bir tüpte küçük parçalar halinde 10 g et üretilmiştir. Enstitü, yapay etin hızlı ve ucuz üretimi için 2025-2030 yılları arasında büyük biyolojik reaktörlerin dizayn edileceğini tahmin etmektedir. Yapay et, gıda amaçlı yetiştirilen bazı hayvanlardan alınan kök hücrelerinin gerekli şartlara sahip (besin öğeleri, enerji kaynakları, büyüme faktörleri vb.) bir biyoreaktörde geliştirilmeleri ve farklılaşmaları ile önce yenilebilir olgun kas hücrelerine ve devamında ise daha büyük kas dokularına dönüştürülmesi sonucu elde edilen ürüne verilen addır. Araştırma ve deneme maliyetlerinin henüz daha istenen seviyede olmaması sebebiyle yapay etin yaygınlaşma süreci oldukça yavaş seyretmektedir (Bhat ve ark., 2015; Sürek ve Pınar, 2020).

Yapay etin gelişimi temel olarak kültür eti ve bitki bazlı et alternatifleri olmak üzere iki alana odaklanmıştır (Mc Clements, 2020). Geleneksel etin alternatifi olarak birkaç et ikamesi geliştirilmiş ve geliştirilmektedir. Örneğin, tamamen bitkisel bileşenlerden oluşan et ikameleri yavaş yavaş artan küçük bir pazar payı kazanmıştır (Egbert ve Borders, 2006). Bu üretim içinse genellikle soya ve buğday bazlı proteinler seçilmiştir ve verimli protein üretimi sağlanmıştır (Hoek ve ark., 2004). Ancak bitkisel bazlı ürünlerin hissini ve tadını geliştirmek için kullanılan teknolojiler sürekli olarak gelişiyor olsa da eti sebze kökenli proteinler, şekerler ve yağlar kullanarak taklit etmek zor görünmektedir (Elzerman, 2006). Bu nedenle bitki kökenli et, ağırlıklı olarak hamburger, sosis veya diğer kıyılmış ürünler gibi işlenmiş etlerde kullanılmaktadır. Böcekler ise başka bir doğal protein kaynağıdır. Yeterli minerallere ek olarak, yüksek protein içeriğine sahiptir (De Foliart, 1992). Yüksek biyo-dönüşüm oranları, büyük ölçekli protein üretimi için uygundur ancak sindirilemeyen kitinden kurtulmak için genellikle dış iskelete sahip böceklere işlem yapılması gerekir (Verkerk ve ark., 2007). Ek olarak kıtalar bazında bir değerlendirme yapılırsa Doğu Asya ve Güney Amerika'daki popülasyonlar böcekleri ortak yiyecek olarak kabul ederken Avrupa'da, Kuzey Amerika'da ve ülkemizde kabulü pek mümkün görünmemektedir. Böcek hücreleri kültürlenerek tanınmayan bir protein kaynağı olarak kullanılırsa, bu isteksizliğin bir kısmının ortadan kalkabileceği düşünülmektedir (DeFoliart, 1992; Schabel, 2010).

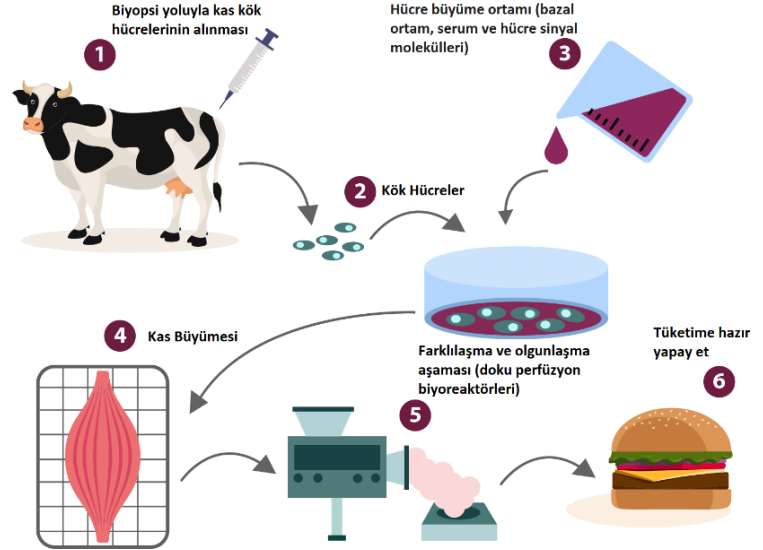
Hayvansal olmayan proteinleri et benzeri liflere dönüştürmek için mevcut üretim teknikleri ve stratejileri, pek çok araştırmacı tarafından kapsamlı bir şekilde tartışılmıştır. Örneğin iskelet kası hem kas liflerini hem de çevredeki kas içi bağ dokularını içerir bu yüzden sadece lifli bir yapı oluşturmanın hayvan etini taklit etmek için yeterli olmadığını gösterir (Listrat ve ark., 2016). Bağ dokuları ve esas olarak kollajenden oluşan hücre dışı matris, kas liflerinin etrafında ince bir tabaka oluşturur ve onları kasların içinde hiyerarşik demetler

halinde tutar (Fratzl, 2008). Anatomik olarak, tek kas genellikle bağ dokusunun en dış tabakası olan epimisyum tarafından iskelete veya kemiğe bağlanır. Bu bağ dokusu kılıfı içinde, bir grup kas lifi demeti perimisyum ile çevrilidir. Her kas lifi, miyofibrillerden oluşur ve doğrudan kas hücre zarına bağlı olan endomisyum ile ayrılır. Epimisyum, perimisyum ve endomisyum, karmaşık ağ mimarisinde hiyerarşik olarak düzenlenmekte olup, kasların morfolojisini ve hareketini destekler (Purslow, 2020). Bu nedenle, yapay etin dokusundaki kusurlar, bağ dokusu ve lifleri içeren entegre iskelet kası yapılarının eksikliğine atfedilebilir, bu da yetersiz bir destek kapasitesi ile sonuçlanır. Ayrıca, entegre iskelet kası yapıları, duyuusal deneyim ve beslenme yararları dahil olmak üzere et kalitesini önemli ölçüde etkiler.

Kök Hücreler, Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği

Yapay et, kas kök hücrelerinin *in vitro* olarak kültürü ve farklılaşması yoluyla üretilen et olarak tanımlanabilir (Şekil 1). Son altmış yılda ortaya çıkan teknolojiler ile (kök hücre izolasyonu ve tanımlaması, *ex vivo* hücre kültürü ve doku mühendisliği) iskelet kası, kemik, kıkırdak, yağ ve fibröz doku gibi diğer mezenkimal dokuların üretimi mümkündür. Bu teknolojiler ile birlikte etin *in vitro* üretimi de yeni ürünler sağlamaktadır. Örneğin, hemen hemen her kaynaktan elde edilen kök hücreler veya hücre kaynaklarının karışımları, şimdiki kadar hayal bile edilemeyen etler için bir başlangıç materyali olarak kullanılabilir (Post, 2012; Kadim ve ark., 2015; Ding ve ark., 2017; Ding ve ark., 2018; Choudhury ve ark., 2020; Fish ve ark., 2020). Bir başka deyişle yapay et üretimi için esas iskelet kas dokusu; indüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPSC'ler), mezenkimal kök hücreler (MSC'ler) veya uydu hücreler (SC'ler) yani kas kök hücreleri tarafından oluşturulmaktadır (Post, 2012). Öte yandan, etin biyokimyasal bileşimi, örneğin çoklu doymamış yağ asitlerinin içeriği artırılarak daha sağlıklı veya özel bir diyet ürünü yapmak için değiştirilebilir. Et üretimi için hücre kültüründe, süreci güvenilir ve verimli hale getirmek için binlerce değişken kontrol edilmelidir. Yapay et üretimi için uygulanan süreç iki aşamada ele alınmaktadır. Bunlardan ilki yani çoğalma aşaması başlangıç hücresinden maksimum hücre sayısını elde etmeye dayalıdır. Farklılaşma ve olgunlaşma aşaması olarak bilinen ikinci aşama ise maksimum protein elde etmeye dayalıdır. Sonrasında uydu hücrelerin kök hücre davranışını korumak için kök hücre nişini mümkün olduğunca yakın bir şekilde yeniden oluşturmak gerekmektedir (Langelaan ve ark., 2010). Ayrıca kültür yüzeyinin kollajen IV gibi bazal membranı taklit eden proteinlerle kaplanması, uydu hücrelerinin çoğalma hızı üzerinde etkiye sahiptir (Wilschut ve ark., 2010). Yeterli hücre ürettikten sonraki hedef onları iskelet kası hücrelerine ayırmak ve maksimum protein üretimine yani hipertrofiye uğratmaktır. Uydu hücreleri için bu süreç neredeyse

doğal olarak gerçekleşmektedir. Sonrasında hücreler erken evre iskelet kası belirteçlerini ifade etmeye başlayacaktır. İskelet kası hücreleri de dahil olmak üzere çoğu mezenkimal hücre, bir kolajen veya kolajen/matrigel jeli ile sıkı bir lif içinde gerilim oluşturacaktır (Grinnell, 2000). Oluşan statik gerilim, biyo-yapay kas denilen kasın protein üretimini muazzam bir şekilde arttırmaktadır (Vandenburgh ve ark., 1999). Kas dokusunun protein içeriği ve kalitesinin büyük kısmını kasılma proteinleri oluştursa da rengi ve tadı için önemli olan başka proteinler de vardır. Özellikle miyogloblin etin pembe renginden kısmen sorumludur ve demirin önemli bir taşıyıcısı olduğu için tadı da belirlemektedir. Miyogloblinin transkripsiyonel regülasyonu oldukça iyi anlaşılabilir olup, MEF2 ve NFAT/kalsinörin transkripsiyonel aktivatörlerini içermektedir (Kanatous ve Mammen, 2010). Kısacası, etkili bir iskelet kası hücre kültürü ve mevcut teknoloji ile mümkündür. Ürünü optimize etmek ve endüstriyel üretimi sağlamak için biyoreaktörler ve uygun tasarıma ihtiyaç vardır ve bugüne dek kaydedilen gelişmeler kabul edilebilir bir et dokusunun taklit edilerek yapay etin üretilebileceğini göstermektedir. Dikkate alınması gereken önemli konular üretim sürecinin ölçeklenebilirliği, memeli hücre/doku kültürlerinin kalite kontrolü, kültürde sterilitenin korunması, kontaminasyon veya hastalığın önlenmesi ve kök hücre donör hayvanlarının kontrollü yetiştirilmesidir. Bu teknik sorunların bir noktada çözülmesi ise muhtemeldir.



Şekil 1. Yapay et üretim süreci (Anonim'den modifiye edilmiştir.)

Figure 1. The production process of artificial meat (Modified from Anonymous source)

Hücrel tarım, hayvan kurban etmeden kök hücre ve doku mühendisliği kullanarak tarımsal ürünler ve yan ürünler üretmeyi amaçlayan agribiyoteknolojinin gelişmekte olan bir araştırma alanıdır (Post ve ark., 2020). Günümüzde, *in vitro* çiftlik hayvanları miyogenezi için kas kök hücrelerinin kültürü, pluripotent kök hücrelerin yönlendirilmiş farklılaşması ve transgenezi kullanarak doğrudan yeniden programlama üzere üç farklı yaklaşım mevcuttur (Ding ve ark., 2017; Bogliotti ve ark., 2018; Choi ve ark., 2019). Şu ana kadar çoğu kültürlü et üretim süreci öncelikle *in vitro* kültüre ve kas kök hücrelerinin farklılaşmasına odaklanmıştır (Kadim ve ark., 2015). Kas kök hücreleri (uydu hücreleri), hareketsiz kök hücreler, miyoblastlar ve soyları dahil olmak üzere kas dokusunun yenilenmesinden sorumludurlar (Kuang ve ark., 2007). Kas dokusu, fetal gelişim sırasında paraksiyal mezodermal progenitör hücrelerden oluşur. Paraksiyal mezoderm, birkaç büyüme faktörü tarafından düzenlenen sıralı gelişim süreci yoluyla miyoblastlara farklılaşır. Miyoblastlar hücreden hücreye füzyon yoluyla kas dokusu oluşturur ve bunların bir kısmı miyofiber bazal laminanın altında bulunur ve doğum sonrası dönemde sessiz uydu hücrelere dönüşür (Chal ve Pourquié, 2017). Kas yaralanması üzerine, hareketsiz uydu hücreleri aktive olur, miyoblastlara farklılaşır ve kas yenilenmesine katkıda bulunur. Hücrelerin farklılaşması, çoğalması ve uyarılmasında pek çok genin ifadesi önemli bir rol üstlenmektedir. Bu genlerin dışında çeşitli vasküler ve nöral hücre adezyon molekülleri, integrinler de görev almaktadır (Asakura ve ark., 2007; Gayraud-Morel ve ark., 2007; Kuang ve ark., 2007; Wang ve ark., 2014). Başka bir deyişle, dışsal ve içsel regülasyonların uyumu, kas kök hücrelerinin kaderini düzenlemektedir. Bu nedenle, *in vitro* olarak kas kök hücrelerini korumak, kas kök hücrelerinin destekleyici fizyolojik özellikleri *in vivo* taklit etmekle mümkündür. Burada da hücre dışı matris (ECM) ve parakrin faktörleri dahil olmak üzere pek çok faktör devreye girmektedir. Ayrıca, güvenilir bir *in vitro* et üretimi için kas kök hücre fizyolojisinin derinlemesine anlaşılması gerekir. Kas kök hücreleri, kas biyopsisi yoluyla ve kesilen hayvanlardan izole edilebilir. İzole kas kök hücrelerinin verimi, donör hayvanların koşulları tarafından değiştirildiğinden, donör hayvan seçiminden önce daha verimli bir uydu hücre izolasyonu için çeşitli faktörler göz önünde bulundurulmalıdır. Örneğin, hayvanların yaşının ve kasların yerleşiminin elde edilen kas kök hücrelerinin sayısını etkilediği çeşitli türlerde kanıtlanmıştır (Gibson ve Schultz, 1983; Keefe ve ark., 2015). Ayrıca, farklı kaslardan izole edilen uydu hücreleri, çeşitli farklılaşma potansiyeli ve çoğalma özellikleri göstermektedir (Redshaw ve ark., 2010). Ek olarak hayvanların cinsiyeti, kas kök hücre büyümesinde rol oynayan başka bir faktördür. Östrojen ve testosteron gibi hormonlar ise kas kök hücre büyümesini etkilemektedir (Day ve ark., 2010; Abdollahi ve ark., 2011). İskelet kası, çeşitli kök

hücre popülasyonlarının yanı sıra kas lifleri, bağ dokuları ve stromal hücrelerden oluşur. Kas kök hücreleri kas lifleri üzerinde yer aldığından, bu hücrelerin başarılı izolasyonları için kas dokusundan verimli bir şekilde ayrılmalrı çok önemlidir. Genel olarak tripsin, pronaz, dispaz ve kollajenaz gibi proteazlar, makas ve et kıyma makinesi ile fiziksel ayrışmayı takiben kas kök hücrelerinin saflaştırılması için kullanılmaktadır. Enzimatik ayrışmadan sonra ise, lif parçaları, doku artıkları ve bağ dokuları, daha sonraki işlemler için kas kök hücre içeren hücrelerden ayrılmalıdır. Boyut ve ağırlıktaki farklılıklara dayalı olarak, filtreleme ve diferansiyel santrifüjleme, kas kök hücrelerini içeren tek çekirdekli hücre popülasyonunu izole etmek için standart yaklaşımlardır. Genel olarak, ayrılmış dokular bir hücre süzgecinden veya 20 ila 40 um gözeneklere sahip naylon ağdan süzülür, daha sonra kalıntıları çıkarmak için yaklaşık 300 g'lık düşük bir g-kuvvetinde santrifüjlenir (Choi ve ark., 2021). Diferansiyel santrifüjlemenin ortaya çıkan süpernatantı somatik hücreler, kan hücreleri, stromal hücreler ve kas kök hücreleri gibi çeşitli hücre tiplerini içerir. Bu nedenle, yüksek oranda saflaştırılmış bir kas kök hücre popülasyonu elde etmek için ayrışma adımını takiben hücre sınıflandırması yapmak esastır (Bischoff 1997; Mau ve ark., 2008). Farklı hücre türlerinin hücre kültürü plakasına yapışması farklı zaman aldığından, bu biyolojik özelliklere dayalı olarak hücre zenginleştirme de gerçekleştirilebilir. Ayrılmış kas dokusunun çeşitli hücre tipleri arasında, kas kök hücrelerinin hücre kültürü plakasına yapışması fibroblastlara ve epitel hücrelerine göre daha uzun sürer. Kültür plakasına ekimden 40 ila 60 dakika sonra, süpernatant hasat edilerek yüksek oranda saflaştırılmış bir kök hücre popülasyonu elde edilebilir, çünkü çoğu fibroblast ve epitel hücreler zaten kültür plakasına eklenmiş durumdadır (Richler ve Yaffe, 1970).

In vitro kas kök hücre kültürleri, ECM, sinyal molekülleri (hormonlar ve sitokinler), metabolitler ve fiziksel ortamlar (sıcaklık, pH ve nem) dahil olmak üzere *in vivo* kök hücre nişlerini taklit ederek elde edilebilir. *In vivo* olarak kas kök hücrelerini çevreleyen bu bileşenler, sentetik kimyasallar ve yapay cihazlar kullanılarak *in vitro* olarak özetlenmiştir. *In vitro* kültür ortamı büyüme ortamı, hücre substratları ve kuçka içermektedir. Hücre substratlarının temel rolü, kök hücrelerde integrin reseptörü aracılı çoğalma, canlılık ve hücrel yaşlanmayı etkileyen hücreler için yapışık bir yüzey sağlamaktır (Guilak ve ark., 2009). Kas kök hücreleri için, fibronektin, laminin ve kollajen gibi çeşitli ECM proteinleri, *in vitro* hücre kültürleri için de uygulanan *in vivo* fiziksel ortamı sağlamaktadır (Yin ve ark., 2013). Hücre büyüme ortamı genellikle bazal ortam, serum ve hücre sinyal moleküllerini içerir. Besinler (amino asitler, karbonhidratlar ve lipitler), vitaminler, inorganik tuzlar ve eser mineraller gibi temel

elementlerden oluşan bazal ortam, hücreler için *in vitro* çözü- nür bir mikro çevre sağlar. Bazal ortam, tıpkı *in vivo* vücut sıvıları gibi, pH ve ozmotik basıncın tamponlanmasında ve ayrıca hücrelerin *in vitro* olarak beslenmesinde rol alır (Ham 1965; Guilbert ve Iscove, 1976). Serum, pıhtılaşmadan sonra kalan ve çeşitli protein kaynakları, besinler ve büyüme fak- törleri içeren kanın sıvı bileşenidir. Bu nedenle, bir hücre kül- türü ortamı takviyesi olarak yaygın olarak kullanılmakta- dır. Kas kök hücre kültürlerinde fetal bovine serum (FBS) ve at serumu (HS) yaygın olarak uygulanmaktadır. Yüksek se- rum konsantrasyonunda kültürlendiğinde kas kök hücre bü- yümesinin kolaylaştırıldığı ve spontan miyojenik farklılaş- manın baskılandığı kanıtlanmıştır (Doumit ve Merkel 1992; Wang ve ark., 2014; Shahini ve ark., 2018). Hormonlar ve büyüme faktörlerinin yanı sıra besinler de hücre büyümesi ve bakımı için gereklidir. Bu nedenle, yukarıda belirtilen bile- şenleri çeşitli kombinasyonlarda kullanarak *in vitro* kültürle- rin fizyolojik özelliklerini düzenlemek mümkündür (Machida ve ark., 2004). *In vitro* hücre kültürleri için vücuda benzer bir fiziksel ortam oluşturmak temel bir kriterdir. İnkü- batörler genellikle hücresel homeostaz için sabit bir sıcaklık, nem, CO₂ ve pH'ı korumak için kullanılmaktadır. Kas kök hücrelerini kültürlenmek için genel inkübatör ayarları vücut sı- caklığına benzetilmektedir (Abdollahi ve ark., 2011; Urbani ve ark., 2012).

Hücrelerin Farklılaşma ve Olgunlaşma Aşaması

Yapay et üretim prosesinin birinci aşaması (çoğalma) hücre kültürü kapları ve şişelerinde gerçekleştirildikten sonra ürün hücrenin çoğalmasına bağlı olarak verimi arttırmak ve kontrollü koşullar sağlamak üzere biyoreaktörlere aktarılma- lıdır (Nienow, 2006). Ayrıca farklılaşma ve olgunlaşma aş- masında 3 boyutlu doku yapıları (hücre yüklü yapı iskeleleri) yer aldığından, doku perfüzyon biyoreaktörlerinin kullanıl- ması önerilmektedir. Bu tür biyoreaktörler, ortamı ya sürekli ya da sürekli olmayan bir şekilde iskele boyunca perfüze et- mek için bir pompalama sistemi kullanmaktadır (Gaspar ve ark., 2012). Tam *in vitro* kas dokusu oluşum süreci için ge- rekli olan yapı iskelesi malzemesi türü canlı hücrelerin *in vivo* ortamını taklit eden üç boyutlu (3B) bir yapıdır - hücre dışı matris (ECM). Bu malzeme mekanik destek sağlar ve hatta doku yapısının potansiyel vaskülarizasyonunu sağlayabilir. Bu nedenle iskele, hücresel tarımın temel bileşenlerinden bi- rini temsil eder. İskele malzemeleri, hücre bağlanması ve bü- yümesi için bir yüzey oluşturarak hücre genişlemesini ve farklılaşmasını destekleyen entegre bir ağ sağlar. Bu göze- nekli ağ, hücre metabolik fonksiyonlarını sürdürmek ve nek- rozu önlemek için oksijen ve besinlerin akışının yanı sıra atıkların uzaklaştırılmasına izin vererek orta difüzyonu en üst düzeye çıkarır. Yapay et için 3D biyobaskı teknolojisi ise uy- gun bir biyomateryal olup aynı anda basılabilir ve basılan

hücreler için iskele görevi görür (Tuomisto ve Mattos, 2011; Handral ve ark., 2020).

Ayrıca yapay et üretimini izlemek için sensör sistemlerinin uygulanması, kontrol ve kültürlenme sürecinin optimize edil- mesine, ortam kullanımından tasarruf edilmesine ve bütün için genel maliyet azalmasına olanak sağlayabileceğinden, bu biyolojik süreç üretim ölçeğinde son derece faydalı olabilir. Çevre parametrelerini, sıcaklık, basınç, akış hızı, viskozite ve benzeri bileşenler oluşturmaktadır. Ayrıca biyolojik ve kim- yasal özellikler de (büyüme oranı, biyokütle, hücre hücrelerin ve ortamın morfolojisi, canlılığı, besin maddelerinin ve me- tabolitlerin konsantrasyonu) bu şekilde takip edilebilmekte- dir. Örneğin ortamın pH'sı takip edilerek hücre büyüme hızı ve metabolizması ile ilgili bilgiler edinilebilir. Çünkü hayvan hücre kültürü için en uygun pH ~7,4'tür. Optimumdan 0,1 pH birimindeki küçük bir değişiklik bile hücre canlılığı ve bü- yüme hızı üzerinde aşırı bir etkiye sahip olabilir. Biyoreak- törlerde pH tipik olarak elektrokimyasal ve optik sensörler kullanılarak izlenir (Beutel ve Henkel 2011; O'Mara ve ark., 2018). pH'ın yanı sıra O₂ ve CO₂'de yukarıda belirtildiği gibi tüm hücre kültürü prosesleri için çok önemli parametreler ol- duğundan biyoreaktörler içine entegre edilmektedir (Potyralo ve ark., 2011). Geleneksel et endüstrisi, farklı et türlerinin ka- lite ve güvenlik değerlendirmesi için çeşitli sensör teknikleri uygulamaktadır. Bundan dolayı sensörlerin düzenli bakımı, yüzeylerinin sterilizasyonu büyük önem taşımaktadır.

Görüntüleme sisteminin kullanılması ise, hücre kültürü hak- kında canlılık, canlı hücre yoğunluğu, toplam hücre yoğun- luğu, hücre sağlığı ve hücre fenotip (morfoloji ile ilgili) gibi çok çeşitli verilerin toplanmasını sağlar (Jensen 2013; Cole 2014; Shen ve ark., 2018).

Yapay Etin Pazar Kabul Edilebilirliği, Uygulanan Yönetmelikler ve Geleceği

Yapay etin farklı biçimleri, doğası ve uygulanan teknolojiler ticari uygulamaları açısından hem engeller hem de avantajlar içermektedir. Avantajlar ve dezavantajları Tablo 2 ve 3'te gösterilmiştir. Genel itibarıyla avantajları ve dezavantajları konusunda bilim camiasında fikir birliği oluşmamıştır (Fer- nandes ve ark., 2021). Üreticiler açısından ise ürünler, seri üretim ve pazarın önemli bir bölümünü tedarik edebilecek ka- pasiteye sahip olmalıdır. Çünkü her ürün ideal olarak, kuru- lum maliyetlerini ve sektör için ilk riski azaltacak şekilde ha- reket eden mevcut altyapıda sınırlı değişikliklerle üretilebilir. Tüketicilerin, aşına oldukları mevcut bir ürüne benzer bir ürünü satın alma olasılıkları daha yüksektir. Bu nedenle, sa- tışa sunulmuş bir yapay etin geleneksel et ile rekabet edebil- mesi açısından görünüm ve tat başta olmak üzere tüketicilerin zihnindeki konumu yakından taklit etmesi veya yeniden oluş-

turması gerekir (Verbeke ve ark., 2010). Bundan dolayı yapay et için en önemli engel tüketici tarafından kabul edilebilirliktir. Kullanılan hücre kültürü yaklaşımları *in vitro* et geliştirmenin ilk aşamalarındadır ve teknolojinin ticari olarak sunulması en az 10-20 yıl uzaktadır (Mattick ve Allenby, 2013). Bu teknolojinin gerçekleştirilmesi için hükümet ve sanayi iş birlikleri tarafından önemli taahhütler ve yatırımlar gerekmektedir. Çünkü örneğin, insan tüketimi için yapılan ilk *in vitro* burgerin üretim maliyeti 335 000 USD'dir. Ek olarak, *in vitro* et işletmesi, bir dizi test edilmemiş teknolojiye sahip tamamen yeni tip bir üretim tesisinin inşasını gerektirecektir.

Bu, ticari kuruluşlar için önemli bir risk teşkil etmektedir ancak *in vitro* etin piyasaya çıkması durumunda tüketici tepkilerinin olumlu olduğu ve ürüne ilgi duyulduğu anlaşılmıştır (Goodwin ve Shoulders, 2013). Bir başka konu ise klonlanmış hayvanlardan elde edilen gıda ürünleri, ABD'de insan tüketimi için güvenli kabul edilirken, Avrupa Birliği'nde yasaklanmıştır. Ayrıca klonlama işlemi hala nispeten pahalıdır (Verzijden ve Lawyers, 2012).

Tablo 2. Yapay etin avantajları (Bhat ve ark., 2015; Bonny ve ark., 2015; Joshi ve Kumar 2015; Kumar ve ark., 2017; Van Eenennaam, 2017; Gaydhane ve ark., 2018)

Table 2. The advantages of artificial meat (Bhat ve ark., 2015; Bonny ve ark., 2015; Joshi ve Kumar 2015; Kumar ve ark., 2017; Van Eenennaam, 2017; Gaydhane ve ark., 2018)

| | |
|--|---|
| Tasarımı sağlıklıdır | Yapay eti sağlıklı hale getirmek için kültür ortamı, yağ asidi ve besinlerin bileşimi değiştirilebilir. Örneğin, zararlı yağları omega-3 gibi sağlıklı yağlarla değiştirmek kardiyovasküler hastalıkları önleyebilir. |
| Hızlı üretim | Yapay etin kültürlenmesi sadece birkaç hafta sürer. |
| Kaynak kullanımında azalma, çevre dostu | Yapay et üretimi sera gazı emisyonunu, enerji kullanımını, toprak ve su kullanımını azaltabilir. |
| Ağaçlandırma ve vahşi yaşam | Arazi kullanımındaki azalma, arazinin yeniden ağaçlandırılması ve nesli tükenmekte olan türlerin restorasyonunu sağlar. |
| Egzotik etin mevcudiyeti | Yapay et üretimi için hayvanın kök hücrelerine ihtiyaç duyulduğundan, nesli tükenmekte olan hayvanlardan alınan hücreler veya hatta soyu tükenmiş hayvan hücresi örnekleri egzotik et üretmek için kullanılabilir. |
| Vegan et | Ahlaki ve sağlık sorunları nedeniyle vejeteryen olan insanlar, hayvanlar ölürülmeden üretilmediği için yapay et yiyebilirler. |

Tablo 3. Yapay etin dezavantajları (Aydın, 2021)

Table 3. The disadvantages of artificial meat (Aydın, 2021)

| | |
|----------------------------------|--|
| Kişisel endişeler | Büyük ölçüde doğal olmama ve doğal lezzetin elde edilemeyeceği endişesi. |
| Üretim sürecinin kontrolü | Geleneksel et anatomik olarak çeşitli kasları içermektedir, bu bağlamda kök hücreler veya kas hücreleri ile kas liflerini yeniden üretmek oldukça titizlik gerektirmektedir. |
| Obezite sorunu | Üretilen etin geleneksel etten daha ucuz ve seri üretilmesinin daha kolay olduğu kanıtlandığı takdirde bazı araştırmacılar bunun aşırı tüketimi teşvik edebileceğini ve obezite ilgili sorunları artırabileceğini düşünmektedir. |
| Toplumsal sorunlar | Geçim kaynaklarına yönelik potansiyel bir tehdit olabileceği düşünülmektedir. |
| Çevresel problemler | Ekolojik dengenin bozulabileceği gibi varsayımlar söz konusudur. |
| Etik kaygılar | Hücre kültürü çalışmalarında hayvanlardan elde edilen serumların tercih edilmesi tüketim esnasında beslenme seçimine göre kişisel bir seçim olmakla birlikte serumların elde edilmesinde seri üretim ile birlikte daha çok hayvana zarar verilme ihtimalinin oluşması. |

Geleneksel et ve yapay etin mevcut düzenleme çerçeveleri karşılaştırıldığında ise dikkate değer benzerlikler olduğu gözlemlenebilmektedir. Bunların başında hem hazırlık hem de paketleme aşamalarında (yapay et için paketleme aşaması henüz gerçekleşmemiş olsa da) her iki kategori için de gıda güvenliği kriterleri ve hijyen kurallarının yerine getirilmesi gerekmektedir. Ayrıca ülkeler ve kıtalar bazında gıda üzerine düzenleyici farklılıklar görülmektedir. Özellikle gelişmiş ülkelerde tüketiciler, herhangi bir hayvanın insan gıdası üretiminde kullanılması konusuna karşı durumdadır (Croney ve ark., 2012). Ayrıca artan insan nüfusu ile birlikte et talebi giderek artmakta, mevcut kaynaklar yaşanan iklim krizinin etkisi ile hızla azalmakta ve düzenleyici ortam daha karmaşık hale gelmektedir. Tüm bu koşullar altında geleneksel et üretiminin daha yüksek maliyetlere maruz kalması yani etin daha pahalı hale gelmesi muhtemeldir. Geleneksel etin fiyatı arttıkça ucuz alternatiflere olan talebin artacağı öngörülmektedir. *In vitro* kültürlenmiş etler pazara girmeden önce aşılması gereken hâlâ önemli teknolojik ve/veya düzenleyici engellere sahiptir. Bazı bilim adamları, ürünün asla ticarileşmeyeceğini iddia ederken, diğerleri et endüstrisinde devrim yaratacağını iddia etmektedir (Chiles, 2013). Ayrıca gelecek yıllarda geleneksel et üretiminin kalitesi, hayvan refahı ve sürdürülebilirlik üzerine iyileştirmeler yapılması ya da agroekolojik ürünlere ilgi duyan tüketicilerin, bu sistemlerin çıktılarını ilgi duyarak et tüketimini azaltmaları ve alternatif protein kaynakları alımlarını artırmaları da muhtemeldir. Tüm bu olasılıklar ve tekniklerin ortaya çıkması ve iyileştirilmesi halinde farklı sektörlerle hitap eden, rekabet ortamının arttığı farklı ürün ve ürün gruplarından oluşan karmaşık bir pazarın ortaya çıkacağı öngörülmektedir (Bonny ve ark., 2015).

Sonuç

Sonuç olarak geleneksel et endüstrisi değişen bir pazarla karşı karşıyadır. Farklı tüketici grupları, mevcut et üretim uygulamalarında çeşitli değişiklikler talep etmektedir ve bu baskılardan herhangi birinin göz ardı edilmesinin sektör için zararlı olacağı düşünülmektedir. Yapay et teknolojileri, canlı bir hayvandan biyopsi alınarak ve bu kas parçasının, çoğalma yeteneğine sahip olan, dönüştürebilen kök hücreler aracılığıyla besin ve büyüme faktörlerinin sağlandığı uygun bir kültür ortamında üretilmektedir. Bu süreç boyunca hücreler, laboratuvarlarda yetiştirilen etin gelişimini sağlamak için uygun koşullarda tutulmaktadır. Dolayısıyla tüketicilerin çevresel sürdürülebilirlik, sağlık sorunları ve hayvan refahı gibi değişen taleplerini karşılamak için çığır açan teknikler ve teknolojiler kullanılmaktadır. Yine de bu ürünlerin pazara geniş ölçekte girebilmesi için aşılması gereken bazı engeller mevcuttur. Gelecekte pazara en uygun ürünler diğer ürünleri geride bırakacak ve et endüstrisinin geleceğini belirleyecektir. Hayvanla-

rın kullanıldığı geleneksel et üretiminin ise yapay etin getirildiği bazı endişeler ve dezavantajlar sebebiyle tamamen ortadan kaldırılmasının pek olası olmadığı düşünülmektedir. Ancak piyasanın iyileştirmeye gitmesi ise kaçınılmazdır.

Etik Standart ile Uyumluluk

Çıkar çatışması: Yazarlar bu yazı için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

Etik izin: Araştırma niteliği bakımından etik izne tabii değildir.

Finansal destek: -

Teşekkür: -

Açıklama: -

Kaynaklar

Abdollahi, H., Harris, L.J., Zhang, P., McIlhenny, S., Srinivas, V., Tulenko, T., DiMuzio, P.J. (2011). The role of hypoxia in stem cell differentiation and therapeutics. *Journal of Surgical Research*, 165(1), 112-117. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2009.09.057>

Agovino, M., Casaccia, M., Ciommi, M., Ferrara, M., Marchesano, K. (2019). Agriculture, climate change and sustainability: The case of EU-28. *Ecological Indicators*, 105, 525-543. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.04.064>

Alexander, P., Brown, C., Arneith, A., Dias, C., Finnigan, J., Moran, D., Rounsevell, M.D. (2017). Could consumption of insects, cultured meat or imitation meat reduce global agricultural land use? *Global Food Security*, 15, 22-32. <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2017.04.001>

Anomaly, J. (2020). Cultured meat could prevent the next pandemic. *Animal Sentience*, 5(30), 5. <https://doi.org/10.51291/2377-7478.1633>

Anonim (2021). <https://www.alamy.com/infographic-explaining-the-process-of-producing-artificial-meat-without-killing-animals-image389151727.html> Contributor: Wirestock, Inc./Alamy Stock Photo.

Asakura, A., Hirai, H., Kablar, B., Morita, S., Ishibashi, J., Piras, B.A., Rudnicki, M.A. (2007). Increased survival of muscle stem cells lacking the MyoD gene after transplantation into regenerating skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(42), 16552-16557.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0708145104>

Aydın, F. (2021). Preservice science teachers perceptions of artificial meat in the context of socio-scientific issue. *International e-Journal of Educational Studies*, 5, 118-32. <https://doi.org/10.31458/iejcs.927717>

Beutel, S., Henkel, S. (2011). In situ sensor techniques in modern bioprocess monitoring. *Applied microbiology and biotechnology*, 91(6), 1493-1505. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3470-5>

Bhat, Z.F., Kumar, S., Fayaz, H. (2015). In vitro meat production: Challenges and benefits over conventional meat production. *Journal of integrative agriculture*, 14(2), 241-248. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(14\)60887-X](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(14)60887-X)

Bischoff, R. (1997). Chemotaxis of skeletal muscle satellite cells. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 208(4), 505-515. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(199704\)208:4<505::AID-AJA6>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(199704)208:4<505::AID-AJA6>3.0.CO;2-M)

Bogliotti, Y.S., Wu, J., Vilarino, M., Okamura, D., Soto, D. A., Zhong, C., Belmonte, J.C.I. (2018). Efficient derivation of stable primed pluripotent embryonic stem cells from bovine blastocysts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(9), 2090-2095. <https://doi.org/10.1073/pnas.1716161115>

Bonny, S.P., Gardner, G.E., Pethick, D.W., Hocquette, J.F. (2015). What is artificial meat and what does it mean for the future of the meat industry? *Journal of Integrative Agriculture*, 14(2), 255-263. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(14\)60888-1](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(14)60888-1)

Bredahl, L., Grunert, K.G., Fertin, C. (1998). Relating consumer perceptions of pork quality to physical product characteristics. *Food Quality and Preference*, 9(4), 273-281. [https://doi.org/10.1016/S0950-3293\(98\)00007-X](https://doi.org/10.1016/S0950-3293(98)00007-X)

Chal, J., Pourquié, O. (2017). Making muscle: skeletal myogenesis in vivo and in vitro. *Development*, 144(12), 2104-2122. <https://doi.org/10.1242/dev.151035>

Chiles, R.M. (2013). If they come, we will build it: in vitro meat and the discursive struggle over future agrofood expectations. *Agriculture and Human Values*, 30(4), 511-523.

<https://doi.org/10.1007/s10460-013-9427-9>

Choi, K.H., Lee, D.K., Kim, S.W., Woo, S.H., Kim, D.Y., Lee, C.K. (2019). Chemically defined media can maintain pig pluripotency network in vitro. *Stem Cell Reports*, 13(1), 221-234. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2019.05.028>

Choi, K.H., Yoon, J.W., Kim, M., Lee, H.J., Jeong, J., Ryu, M., Lee, C.K. (2021). Muscle stem cell isolation and in vitro culture for meat production: A methodological review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(1), 429-457. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12661>

Choudhury, D., Tseng, T. W., Swartz, E. (2020). The business of cultured meat. *Trends in Biotechnology*, 38(6), 573-577. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.02.012>

Cole, R. (2014). Live-cell imaging: The cell's perspective. *Cell Adhesion & Migration*, 8(5), 452-459. <https://doi.org/10.4161/cam.28348>

Croney, C., Apley, M., Capper, J., Mench, J., Priest, S. (2012). Bioethics Symposium: The ethical food movement: What does it mean for the role of science and scientists in current debates about animal agriculture? *Journal of Animal Science*, 90(5), 1570-1582. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4702>

Day, K., Shefer, G., Shearer, A., Yablonka-Reuveni, Z. (2010). The depletion of skeletal muscle satellite cells with age is concomitant with reduced capacity of single progenitors to produce reserve progeny. *Developmental biology*, 340(2), 330-343. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.01.006>

DeFoliart, G.R. (1992). Insects as human food: Gene DeFoliart discusses some nutritional and economic aspects. *Crop Protection*, 11(5), 395-399. [https://doi.org/10.1016/0261-2194\(92\)90020-6](https://doi.org/10.1016/0261-2194(92)90020-6)

Derossi, A., Bhandari, B., van Bommel, K., Noort, M., Severini, C. (2021). Could 3D food printing help to improve the food supply chain resilience against disruptions such as caused by pandemic crises?. *International Journal of Food Science & Technology*, 56(9), 4338-4355.

Ding, S., Swennen, G.M., Messmer, T., Gagliardi, M., Molin, D.G., Li, C., Post, M.J. (2018). Maintaining bovine

satellite cells stemness through p38 pathway. *Scientific Reports*, 8(1), 1-12.

<https://doi.org/10.1038/s41598-018-28746-7>

Ding, S., Wang, F., Liu, Y., Li, S., Zhou, G., Hu, P. (2017). Characterization and isolation of highly purified porcine satellite cells. *Cell Death Discovery*, 3(1), 1-11.

<https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2017.3>

Djialov, M., Knežić, T., Podunavac, I., Živojević, K., Radonic, V., Knežević, N.Ž., Gadjanski, I. (2021). Cultivating Multidisciplinary: Manufacturing and Sensing Challenges in Cultured Meat Production. *Biology*, 10(3), 204.

<https://doi.org/10.3390/biology10030204>

Doumit, M.E., Merkel, R.A. (1992). Conditions for isolation and culture of porcine myogenic satellite cells. *Tissue and Cell*, 24(2), 253-262.

[https://doi.org/10.1016/0040-8166\(92\)90098-R](https://doi.org/10.1016/0040-8166(92)90098-R)

Egbert, R., Borders, C. (2006). Achieving success with meat analogs. *Food Technology (Chicago)*, 60(1), 28-34.

Elzerman, H. (2006). Substitution of meat by NPFs: Sensory properties and contextual factors. *Environment and Policy*, 45, 116.

Fernandes, A.M., Teixeira, O.S., Revillion, J.P., Souza, A. (2021). Panorama and ambiguities of cultured meat: an integrative approach. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-11.

<https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1885006>

Fish, K.D., Rubio, N.R., Stout, A.J., Yuen, J.S., Kaplan, D.L. (2020). Prospects and challenges for cell-cultured fat as a novel food ingredient. *Trends in Food Science & Technology*, 98, 53-67.

<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.02.005>

Fox, E.M., Leonard, N., Jordan, K. (2011). Molecular diversity of *Listeria monocytogenes* isolated from Irish dairy farms. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(5), 635-641.

<https://doi.org/10.1089/fpd.2010.0806>

Fratzl, P. (2008). Collagen: Structure and mechanics, an introduction. In *Collagen* (pp. 1-13): Springer. ISBN: 978-0-387-73906-9

https://doi.org/10.1007/978-0-387-73906-9_1

Gaspar, D.A., Gomide, V., Monteiro, F.J. (2012). The role of perfusion bioreactors in bone tissue engineering. *Biomatter*, 2(4), 167-175.

<https://doi.org/10.4161/biom.22170>

Gaydhane, M.K., Mahanta, U., Sharma, C.S., Khandelwal, M., Ramakrishna, S. (2018). Cultured meat: state of the art and future. *Biomanufacturing Reviews*, 3(1), 1-10.

<https://doi.org/10.1007/s40898-018-0005-1>

Gayraud-Morel, B., Chrétien, F., Flamant, P., Gomès, D., Zammit, P.S., Tajbakhsh, S. (2007). A role for the myogenic determination gene *Myf5* in adult regenerative myogenesis. *Developmental Biology*, 312(1), 13-28.

<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.08.059>

Gibson, M.C., Schultz, E. (1983). Age-related differences in absolute numbers of skeletal muscle satellite cells. *Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine*, 6(8), 574-580.

<https://doi.org/10.1002/mus.880060807>

Goodwin, J. N., Shoulders, C.W. (2013). The future of meat: A qualitative analysis of cultured meat media coverage. *Meat Science*, 95(3), 445-450.

<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.05.027>

Grinnell, F. (2000). Fibroblast–collagen–matrix contraction: growth-factor signalling and mechanical loading. *Trends in Cell Biology*, 10(9), 362-365.

[https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(00\)01802-X](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(00)01802-X)

Guilak, F., Cohen, D.M., Estes, B.T., Gimble, J.M., Liedtke, W., Chen, C.S. (2009). Control of stem cell fate by physical interactions with the extracellular matrix. *Cell Stem Cell*, 5(1), 17-26.

<https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.06.016>

Guilbert, L., Iscove, N. (1976). Partial replacement of serum by selenite, transferrin, albumin and lecithin in haemopoietic cell cultures. *Nature*, 263(5578), 594-595.

<https://doi.org/10.1038/263594a0>

Ham, R.G. (1965). Clonal growth of mammalian cells in a chemically defined, synthetic medium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 53(2), 288.

<https://doi.org/10.1073/pnas.53.2.288>

- Hoek, A.C., Luning, P.A., Stafleu, A., de Graaf, C. (2004).** Food-related lifestyle and health attitudes of Dutch vegetarians, non-vegetarian consumers of meat substitutes, and meat consumers. *Appetite*, 42(3), 265-272. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2003.12.003>
- Ismail, B.P., Senaratne-Lenagala, L., Stube, A., Brackenridge, A. (2020).** Protein demand: Review of plant and animal proteins used in alternative protein product development and production. *Animal Frontiers*, 10(4), 53-63. <https://doi.org/10.1093/af/vfaa040>
- Jensen, E.C. (2013).** Overview of live-cell imaging: requirements and methods used. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 296(1), 1-8. <https://doi.org/10.1002/ar.22554>
- Joshi, V., Kumar, S. (2015).** Meat Analogues: Plant based alternatives to meat products-A review. *International Journal of Food and Fermentation Technology*, 5(2), 107-119. <https://doi.org/10.5958/2277-9396.2016.00001.5>
- Handral, H.K., Tay, S.H., Chan, W.W., Choudhury, D. (2020).** 3D Printing of cultured meat products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(1), 272-281.
- Kadim, I.T., Mahgoub, O., Baqir, S., Faye, B., Purchas, R. (2015).** Cultured meat from muscle stem cells: A review of challenges and prospects. *Journal of Integrative Agriculture*, 14(2), 222-233. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(14\)60881-9](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(14)60881-9)
- Kanatous, S.B., Mammen, P.P. (2010).** Regulation of myoglobin expression. *Journal of Experimental Biology*, 213(16), 2741-2747. <https://doi.org/10.1242/jeb.041442>
- Keefe, A.C., Lawson, J.A., Flygare, S.D., Fox, Z.D., Colasanto, M.P., Mathew, S.J., Kardon, G. (2015).** Muscle stem cells contribute to myofibres in sedentary adult mice. *Nature Communications*, 6(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/ncomms8087>
- Kuang, S., Kuroda, K., Le Grand, F., Rudnicki, M.A. (2007).** Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell*, 129(5), 999-1010. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.044>
- Kumar, P., Chatli, M., Mehta, N., Singh, P., Malav, O., Verma, A.K. (2017).** Meat analogues: Health promising sustainable meat substitutes. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(5), 923-932. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.939739>
- Langelaan, M.L., Boonen, K.J., Polak, R.B., Baaijens, F.P., Post, M.J., van der Schaft, D.W. (2010).** Meet the new meat: tissue engineered skeletal muscle. *Trends in Food Science & Technology*, 21(2), 59-66. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.11.001>
- Listrat, A., Lebret, B., Louveau, I., Astruc, T., Bonnet, M., Lefaucheur, L., Bugeon, J. (2016).** How muscle structure and composition influence meat and flesh quality. *The Scientific World Journal*, 2016, 3182746. <https://doi.org/10.1155/2016/3182746>
- Machida, S., Spangenburg, E., Booth, F. (2004).** Primary rat muscle progenitor cells have decreased proliferation and myotube formation during passages. *Cell Proliferation*, 37(4), 267-277. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2004.00311.x>
- Mattick, C., Allenby, B. (2013).** The future of meat. *Issues in Science and Technology*, 30(1), 64-70.
- Mattick, C.S. (2018).** Cellular agriculture: The coming revolution in food production. *Bulletin of the Atomic Scientists*, 74(1), 32-35. <https://doi.org/10.1080/00963402.2017.1413059>
- Mau, M., Oksbjerg, N., Rehfeldt, C. (2008).** Establishment and conditions for growth and differentiation of a myoblast cell line derived from the semimembranosus muscle of newborn piglets. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 44(1-2), 1-5. <https://doi.org/10.1007/s11626-007-9069-6>
- Mc Clements, D.J. (2020).** Future foods: How modern science is transforming the way we eat. *Food & Function* 11(3) 1933-1945. <https://doi.org/10.1039/C9FO02076D>
- Mc Leod, A. (2011).** World livestock 2011-livestock in food security. *Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)*. <http://www.fao.org/3/i2373e/i2373e.pdf>
- Nienow, A.W. (2006).** Reactor engineering in large scale animal cell culture. *Cytotechnology*, 50(1-3), 9. <https://doi.org/10.1007/s10616-006-9005-8>

- O'Mara, P., Farrell, A., Bones, J., Twomey, K. (2018). Staying alive! Sensors used for monitoring cell health in bioreactors. *Talanta*, 176, 130-139.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.07.088>
- Ong, S., Choudhury, D., Naing, M.W. (2020). Cell-based meat: current ambiguities with nomenclature. *Trends in Food Science & Technology*, 102, 223-231.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.02.010>
- Pereira, P.M.d.C.C., Vicente, A.F.d.R.B. (2013). Meat nutritional composition and nutritive role in the human diet. *Meat Science*, 93(3), 586-592.
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.09.018>
- Post, M.J. (2012). Cultured meat from stem cells: Challenges and prospects. *Meat Science*, 92(3), 297-301.
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.04.008>
- Post, M.J., Levenberg, S., Kaplan, D.L., Genovese, N., Fu, J., Bryant, C.J., Moutsatsou, P. (2020). Scientific, sustainability and regulatory challenges of cultured meat. *Nature Food*, 1(7), 403-415.
<https://doi.org/10.1038/s43016-020-0112-z>
- Potyrailo, R.A., Surman, C., Monk, D., Morris, W.G., Wortley, T., Vincent, M., Gach, G. (2011). RFID sensors as the common sensing platform for single-use biopharmaceutical manufacturing. *Measurement Science and Technology*, 22(8), 082001.
<https://doi.org/10.1088/0957-0233/22/8/082001>
- Purslow, P.P. (2020). The structure and role of intramuscular connective tissue in muscle function. *Frontiers in Physiology*, 11, 495.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00495>
- Redshaw, Z., McOrist, S., Loughna, P. (2010). Muscle origin of porcine satellite cells affects in vitro differentiation potential. *Cell Biochemistry and Function*, 28(5), 403-411.
<https://doi.org/10.1002/cbf.1670>
- Richler, C., Yaffe, D. (1970). The in vitro cultivation and differentiation capacities of myogenic cell lines. *Developmental Biology*, 23(1), 1-22.
[https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(70\)80004-5](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(70)80004-5)
- Rischer, H., Szilvay, G.R., Oksman-Caldentey, K.-M. (2020). Cellular agriculture—industrial biotechnology for food and materials. *Current opinion in biotechnology*, 61, 128-134.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.12.003>
- Schabel, H.G. (2010). Forest insects as food: A global review. *Forest insects as food: Humans Bite Back*, Food & Agriculture Org. ISBN: 978-92-5-106488-7.
- Sexton, A.E., Garnett, T., Lorimer, J. (2019). Framing the future of food: The contested promises of alternative proteins. *Environment and Planning E: Nature and Space*, 2(1), 47-72.
<https://doi.org/10.1177/2514848619827009>
- Sha, L., Xiong, Y.L. (2020). Plant protein-based alternatives of reconstructed meat: Science, technology, and challenges. *Trends in Food Science & Technology*, 102, 51-61.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.05.022>
- Shahini, A., Vydiyam, K., Choudhury, D., Rajabian, N., Nguyen, T., Lei, P., Andreadis, S.T. (2018). Efficient and high yield isolation of myoblasts from skeletal muscle. *Stem Cell Research*, 30, 122-129.
<https://doi.org/10.1016/j.scr.2018.05.017>
- Shen, N., Riedl, J.A., Berrio, D.A.C., Davis, Z., Monaghan, M.G., Layland, S.L., Schenke-Layland, K. (2018). A flow bioreactor system compatible with real-time two-photon fluorescence lifetime imaging microscopy. *Biomedical Materials*, 13(2), 024101.
<https://doi.org/10.1088/1748-605X/aa9b3c>
- Specht, L., Scientist, S. (2020). An analysis of culture medium costs and production volumes for cultivated meat. *The Good Food Institute: Washington, DC, USA*.
- Steinfeld, H., Gerber, P., Wassenaar, T., Castel, V., Rosales, M., Rosales, M., de Haan, C. (2006). *Livestock's long shadow: environmental issues and options*: Food & Agriculture Org. ISBN: 978-92-5-106488-7
- Sürek, E., Pinar, U. (2020). Geleceğin alternatif protein kaynağı: Yapay et. *Akademik Gıda*, 18(2), 209-216.
<https://doi.org/10.24323/akademik-gida.758840>
- Tuomisto, H.L., Teixeira de Mattos, M.J. (2011). Environmental impacts of cultured meat production. *Environmental Science & Technology*, 45(14), 6117-6123.
<https://doi.org/10.1021/es200130u>
- Urbani, L., Piccoli, M., Franzin, C., Pozzobon, M., De Coppi, P. (2012). Hypoxia increases mouse satellite cell clone proliferation maintaining both in vitro and in vivo heterogeneity and myogenic potential. *PLoS ONE*, 7(11), e49860.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049860>

Van Boeckel, T.P., Pires, J., Silvester, R., Zhao, C., Song, J., Criscuolo, N.G., Laxminarayan, R. (2019). Global trends in antimicrobial resistance in animals in low-and middle-income countries. *Science*, 365(6459).

<https://doi.org/10.1126/science.aaw1944>

Van Eenennaam, A.L. (2017). Genetic modification of food animals. *Current Opinion in Biotechnology*, 44, 27-34.

<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.10.007>

Vandeburgh, H., Shansky, J., Del Totto, M., Chromiak, J. (1999). Organogenesis of skeletal muscle in tissue culture. In *Tissue Engineering Methods and Protocols* (pp. 217-225): Springer. ISBN: 978-1-59259-602-7

<https://doi.org/10.1385/0-89603-516-6:217>

Vasileska, A., Rechkoska, G. (2012). Global and regional food consumption patterns and trends. *Procedia-Social and Behavioral Sciences*, 44, 363-369.

<https://doi.org/10.1016/j.sbspro.2012.05.040>

Verbeke, W., Pérez-Cueto, F.J., de Barcellos, M.D., Krystallis, A., Grunert, K.G. (2010). European citizen and consumer attitudes and preferences regarding beef and pork. *Meat Science*, 84(2), 284-292.

<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.05.001>

Verbeke, W., Van Wezemael, L., de Barcellos, M.D., Kügler, J.O., Hocquette, J.-F., Ueland, Ø., Grunert, K.G.

(2010). European beef consumers' interest in a beef eating-quality guarantee: insights from a qualitative study in four EU countries. *Appetite*, 54(2), 289-296.

<https://doi.org/10.1016/j.appet.2009.11.013>

Verhagen, J.H., Fouchier, R.A., Lewis, N. (2021). Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses at the Wild-Domestic Bird Interface in Europe: Future Directions for Research and Surveillance. *Viruses*, 13(2), 212.

<https://doi.org/10.3390/v13020212>

Verkerk, M., Tramper, J., Van Trijp, J., Martens, D. (2007). Insect cells for human food. *Biotechnology Advances*, 25(2), 198-202.

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.11.004>

Verzijden, K., Lawyers, A. (2012). Update on cloning in relation to foot production. *EFSA Journal* 10(7), 2794.

Wang, Y.X., Dumont, N.A., Rudnicki, M.A. (2014). Muscle stem cells at a glance. *Journal of Cell Science*, 127(21), 4543-4548.

<https://doi.org/10.1242/jcs.151209>

Wilschut, K.J., Haagsman, H.P., Roelen, B.A. (2010). Extracellular matrix components direct porcine muscle stem cell behavior. *Experimental Cell Research*, 316(3), 341-352.

<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.10.014>

Yin, H., Price, F., Rudnicki, M.A. (2013). Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiological Reviews*, 93(1), 23-67.