

基于肌管定向排列的细胞培养肉支架制造技术

娄行行¹, 张圣良¹, 史 璘¹, 陈启和^{1,2*}

(¹ 浙江大学生物系统工程与食品科学学院 杭州 310058

² 浙江大学长三角智慧绿洲创新中心 浙江嘉兴 314100)

摘要 细胞培养肉技术前景广阔,有助于应对传统畜牧业在可持续性和环境方面的难题。与其它替代蛋白不同,细胞培养肉是由动物干细胞在体外培养而成,是一种最接近天然肉类的产品。为了使细胞培养肉尽可能具有传统肉类的感官和营养特性,研究人员针对支架特性及支架制造技术开展大量研究,以期复制自然肌肉组织的特性。本文综述可食用支架的制备方法,旨在生产具有排列肌管的组织样细胞培养肉。首先,分析动物源性肉类的组成和结构,并依据天然肌肉组织的结构特性,阐明细胞培养肉工程支架设计的主要考虑因素,其中形成单轴排列的肌管是重点。其次,概述适用于形成排列肌管的主要支架技术及其在细胞培养肉工程中的应用现状。最后,展望其未来发展前景。

关键词 细胞培养肉; 替代蛋白; 定向细胞生长; 肌管排列; 支架

文章编号 1009-7848(2026)01-0383-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2026.01.034

随着人民生活水平的日益提高,营养需求也日益多元化,树立并践行“大食物观”非常重要。“大食物观”旨在转变食物结构,不仅向主粮要食物,更要向“副食”要食物。目前,我国居民逐渐由“吃得饱”向“吃得好”转变,除了以米面为主食以外,更注重肉类等蛋白质的摄入,使得肉类的消费量显著增加。然而,大规模工业化生产肉类会引发与环境有关的系列问题,包括土地和水资源消耗,温室气体排放增加,养分转换效率降低^[1-3]。此外,畜牧业还会引发动物福利和健康问题,例如细菌对抗生素产生耐药性^[4],以及食源性疾病的传播^[5]。为保障肉类产品满足人类需求,需寻找一种可持续的替代蛋白作为补充。人造肉被广泛认为是一种可持续的肉类替代品,根据生产方式不同,人造肉可分为细胞培养肉、植物蛋白肉和微生物蛋白肉^[6]。其中,细胞培养肉(Cultured meat)是替代肉类的可行选择^[7]。细胞培养肉也称为细胞肉(Cell-based meat)或培育肉(Cultivated meat),它是通过体外培养动物细胞,来模仿细胞在体内生长和分化过程,从而生产与传统肉制品具有相似营养和

感官特性的肉类产品^[8-10]。如图 1 所示,细胞培养肉生产过程大致可分为 4 个步骤^[11]。首先,从目标物种中分离出优质种子细胞^[10,12];其次,开发低成本和高增殖率的培养基、合适的生物反应器和生物工艺,来实现种子细胞的大规模扩增^[13-17];第三,开发出模拟细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)功能的食品安全支架,以供细胞增殖和分化,来完成组织成熟^[18-21];最后,通过食品化处理,赋予细胞培养肉与天然肉制品相似的食品品质(颜色、质构和风味等)。

1 细胞培养肉的研究现状

随着细胞生物学和组织工程等技术的发展,肉的体外培养已经成为可能。早在 20 世纪 30 年代,温斯顿·丘吉尔(Winston Churchill)首次提出细胞培养肉的概念。2002 年, Benjaminson 等^[22]利用金鱼(*Carassius*)的成纤维细胞结合组织工程技术,成功培养出金鱼的外植体(Explants),这是第 1 次细胞培养肉的尝试。2013 年,荷兰生物工程师 Mark Post 利用牛肌卫星细胞培养出第 1 块人造牛排并将其制作成汉堡包,然而其成本很高(质量为 85 g, 价格约 33 万美元)^[23]。随后, Memphis meat(后来被称为 Upside Foods)首次制作出细胞培养鸡肉和细胞培养鸭肉^[10]。2019 年,南京农业大学周光宏团队对猪肌肉干细胞进行培养,获得了

收稿日期: 2025-02-11

基金项目: 国家重点研发计划项目(2024YFE0197500)

第一作者: 娄行行,女,博士,工程师

通信作者: 陈启和 E-mail: chenqh@zju.edu.cn

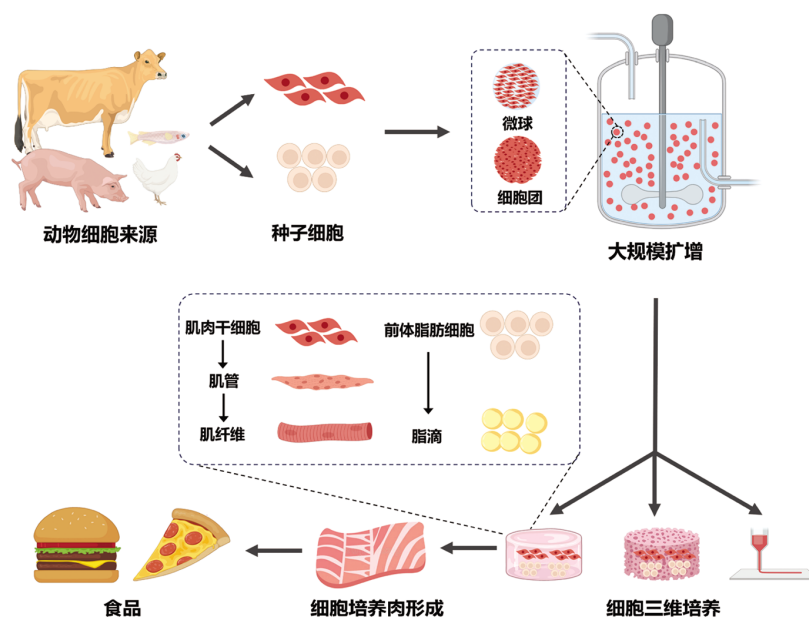


图1 细胞培养肉的生产流程示意图

Fig.1 Schematic of production process for cultured meat

中国第1块细胞培养猪肉^[24]。近十几年,越来越多的公司致力于细胞培养肉的研发。截至2023年7月,全球已经有170多家公司研发细胞培养肉(从碎牛肉到牛排以及鸡肉、猪肉和鱼肉)^[25]。随着细胞培养肉产业发展,各国开始建立和完善细胞培养肉产业监管体系和法律法规。新加坡是全球首个批准销售细胞培养肉产品的国家。2020年12月,新加坡食品局(SFA)审查通过了Eat Just公司的细胞培养鸡肉产品。2023年6月,美国首次批准两家公司(Upside Foods和Good Meat)销售动物细胞培育的鸡肉,成为世界上第2个允许向消费者供应培养肉的国家。目前,我国也在不断推进相关政策的制定和监管工作。虽然细胞培养肉的研究已经取得了一些进展,但是还面临着种子细胞传代率低,种子细胞大规模培养难,细胞培养成本高,细胞培养肉质无法比拟真实肉类等多方面的挑战。其中,制造出与传统肉类质地相似的细胞培养肉是目前研究的主要目标,也是公众接受程度的关键因素^[26-27]。

2 天然肌肉组织的结构

在动物体内,细胞在受控的微环境条件下增殖、分化成成熟组织,这些成熟组织便是可食用的

肉。肌肉组织的结构和成分与肉的感官和营养特性之间有着非常重要联系,细胞培养肉需要有类似天然肉类的营养成分、质地和风味。为生产具有仿生结构的细胞培养肉,有必要了解天然肌肉组织的结构,这有助于支架的设计及应用。

在大部分可食用的脊椎动物(猪、牛、鸡、鱼等)中存在3种肌肉组织,分别为骨骼肌、平滑肌和心肌^[28]。其中骨骼肌是动物机体中最大的组织,是肉的重要来源,占产肉动物胴体体质量的35%~65%^[29]。骨骼肌组成如图2a所示,它是由肌纤维、脂肪、结缔组织以及脉管系统等组成,其中肌纤维约占90%,脂肪组织和结缔组织等约占10%^[29]。骨骼肌主要功能单位是肌肉纤维(Muscle fiber),也称为肌细胞;肌肉纤维被组织成束,称为肌束(Fascicle);肌束再被组织成肌肉^[10]。肌束和肌肉外都包裹着一层结缔组织,分别为肌内膜(Endomysium)、肌束膜(Perimysium)和肌外膜(Epimysium)。肌肉纤维是一种多核细胞,有多达100个细胞核^[10]。成熟的陆生生物肌肉纤维长度为1~40 mm,直径通常为10~100 μm ^[28-29]。如图2b所示,鱼片由重复的V形或W形肌肉组织单元组成,称为肌节(Myomere),又名肌分节,每个肌节周围都有称为肌隔膜(Myoseptum)的结缔组织鞘。与陆生动

物相比,鱼肌肉纤维要短得多,通常只有几毫米^[28]。这些肌细胞中充满直径 1~3 μm 的肌原纤维,这些肌原纤维是由肌动蛋白和肌球蛋白长链组成的束状收缩细丝^[10,28]。肌原纤维的基本单位是肌小节(Sarcomere),又名肌节、肌原纤维节,负责高度协调的活动,如肌肉收缩。简单来讲,不管是陆生动

物还是鱼类,骨骼肌都是由高度分化的多核纤维束(肌管)组成,这些纤维束单轴定向,这一结构特点决定了三维仿生体外模型制作的关键因素,即促进成肌细胞分化为肌管的能力,以及这些肌管高度定向形成密集排列的“束状”结构^[30-31],这对形成仿真细胞培养肉至关重要。

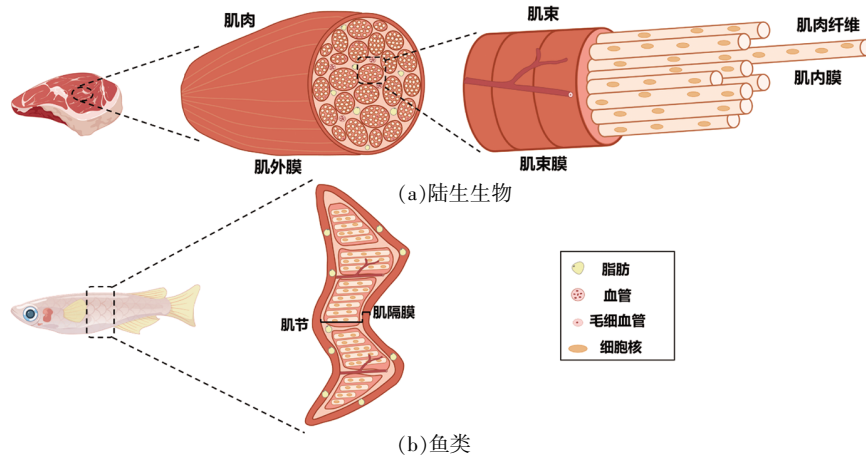


图 2 脊椎动物肌肉的结构组成示意图

Fig.2 Schematic representation of the structural composition of vertebrate muscle

3 基于支架材料加工的技术手段

近年来,骨骼肌结构仿生研究取得了很大进展。在肌肉组织工程中,肌肉细胞可以通过支架基质预先对齐,以促进肌肉成熟。事实上,已有研究表明,当细胞在网状、线状或纤维状的工程对齐微结构中生长时,细胞可以获得几何线索以拉长的方式排列生长,进而促进细胞与细胞融合,并形成排列的肌管^[32-33]。这种线索的有效性取决于生物支架材料的制造方式和生物材料本身的类型^[33]。三维生物打印、静电纺丝、定向冷冻干燥、微成型和微图案化等不同的生物制造技术,可为成肌细胞排列提供地形引导线索(图 3)。

3.1 3D 生物打印技术

3D 生物打印技术(3D bioprinting),以 3D 打印技术为基础,是一种安排细胞和非细胞成分的创新过程,可精确分配和定位具有细胞的生物材料,以构建仿生三维组织^[34]。3D 生物打印技术大致可以分为挤压打印、喷墨打印、光固化式生物打印及激光辅助生物打印^[35-36]。生物墨水是 3D 生物打印的基础和关键,主要由细胞和生物活性材料组



图 3 支架的生物制造技术

Fig.3 The biofabrication techniques of the scaffolds

成^[37]。理想的生物墨水应具备一定的物理、化学与生物学特性,可为细胞提供合适的微环境,支持细胞的各种活动。对于细胞培养肉的应用来说,生物墨水还需要具备可食用的特性,或者在培养期间能够降解为可食用成分^[36-37]。目前,与细胞培养肉

相关的多数生物墨水都基于水凝胶^[10]。因为水凝胶是充满水分的三维网状结构,可模仿细胞外基质,为细胞提供物理和化学线索,并保护细胞免受制造过程中可能产生的诱导力的影响。

3D 生物打印起初被用来制造一些人造器官,应用于生物医学和组织工程^[38-40]。随着相关技术发展,研究人员将 3D 生物打印技术应用于细胞培养肉的生产。利用 3D 生物打印技术生产细胞培养肉,不仅可以控制支架内氧气和营养物质运输所必需的孔隙规模、分布和相互连接,甚至可以调节细胞和生物材料的定位,这在其它技术中是难以实现的^[34,41]。借助 3D 生物打印技术生产的细胞培养肉是一种“高度结构化的肉制品”,它可以模仿传统肉类结构,让消费者更易接受。Liu 等^[42]首先利用 Micro-CT 扫描真实鱼肉组织,再利用生物 3D 打印技术进行仿真鱼排的制造。进一步,通过在生物墨水中添加纳米,以及优化喷嘴直径,实现细胞高密度增殖和肌纤维束的定向排列,使其更接近真实鱼肉^[43](图 4a)。为了模仿真实的牛排组织结构,Kang 等^[44]通过肌腱-凝胶集成生物打印技术(Tendon-gel-integrated bioprinting,TIP)分别打印了 42 根肌肉纤维、28 根脂肪纤维和 2 根毛细血管纤维,并按照实际,将这些纤维组装起来,从

而制造出大小为 5 mm×10 mm×5 mm (W×L×H)的牛排状肉(图 4b)。由于肌腱是肌纤维排列和成熟的关键组织,通过 TIP 制备肌腱凝胶,使其与肌细胞纤维连续连接,可以诱导肌细胞形成排列的成熟肌纤维^[44]。除了单独打印脂肪、血管和肌肉组织来组装细胞培养肉外,还可以将不同的细胞打印在 1 个体系中进行细胞培养肉生产。Jeong 等^[45]利用数字光处理打印技术(Digital light processing-based printing,DLP)打印负载牛纤维细胞的甲基丙烯酸酯化明胶(GelMA)进行厘米级细胞培养牛肉的生产(图 4c)。在之前的报道中,通过将 *MyoD* 和 *PPAR γ 2* 等基因引入自然永生的牛成纤维细胞,使其能在特定的培养基中分别分化为肌肉和脂肪^[46-47]。高精密度结构中引入微通道设计,不仅可促进分化的肌纤维定向排列,还解决了生产大尺寸组织时,氧气和营养物质难以扩散的问题。总而言之,3D 生物打印的多功能性、高精度和可重复性已经使其成为制造细胞培养肉常用的工具。然而,在 3D 生物打印细胞培养肉可供食用之前,仍需要克服一些挑战,包括合规性、大规模大尺寸生产以及安全可食用的生物墨水的开发^[3]、打印效率低等难题。

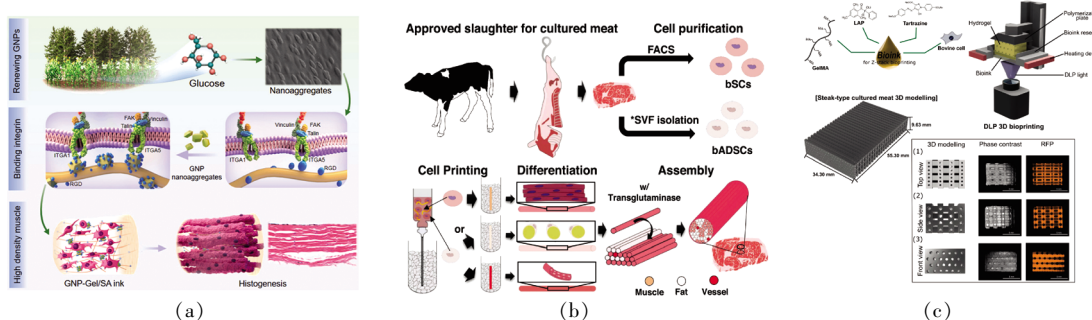


图 4 3D 生物打印在细胞培养肉的应用示例^[43-45]

Fig.4 The application examples of 3D bioprinting in cultured meat field^[43-45]

3.2 纺丝技术

纺丝是指应用于各种制造领域的纤维状材料的生产 and 处理^[48]。纺丝技术可以制造出具有特定排列和结构的纤维。在骨骼肌组织工程中,纤维状支架可以模仿天然细胞外基质的结构和生物功能,为细胞提供附着和生长的环境,故用纺丝技术生产的纤维状支架,来构建体外肌肉组织具有巨

大潜力^[49-51]。纺丝技术包括微流体纺丝、湿法纺丝、干纺丝、静电纺丝和近场静电纺丝^[52]。不同的纺丝技术所制造的纤维直径和状态有所不同。其中,静电纺丝是各种纺丝技术中比较常用的技术,广泛应用于诱导细胞排列生长。电纺丝纤维的空间取向可以调整,利用细胞-支架相互作用,来控制电纺丝支架上生长的细胞的形态^[3]。例如,生产排

列的电纺丝纤维,将细胞接种到电纺丝纤维上,可以诱导细胞排列,并促进肌肉细胞的伸长和肌源性分化^[53-54]。负载细胞的聚合物溶液可以被电纺丝,利用电纺丝的微图案来引导细胞生长,实现细胞的均匀分布,以及增加整个支架的营养物质可及性^[55],这对于形成具有排列肌管的肌肉组织至关重要。虽然基于可食用生物聚合物的静电纺丝技术在人造肉支架的大规模生产中具有广阔前景,但是其在食品系统中的实际应用仍存在诸多挑战。在静电纺丝过程中,会使用一些非食品安全级的溶剂^[56],这对细胞培养肉的制造来讲将是一大挑战。

3.3 定向冷冻干燥技术

定向冷冻干燥(Directional freeze-drying)是制备各向异性多孔支架的一种有效方法,因其通常以水为溶剂,又被称为排列冰模板(Aligned ice templating, AIT)、冰模板(Ice-templating)或冷冻铸造(Freeze casting)^[57]。它适用于多种材料排列孔结构,从聚合物到陶瓷、金属、碳纳米材料和各种复合材料^[58]。与传统冷冻干燥制造各向同性结构不同,定向冷冻干燥可以通过控制冰晶生长的方向,来制造具有三维排列的孔隙结构^[57]。不同的冷冻条件,包括冷冻温度、冷冻时间、冷冻速率、冷冻方向、溶液浓度和聚合物分子质量等,都会对材料的孔隙结构产生很大的影响^[59]。

针对骨骼肌系统,定向冷冻干燥由于其过程简单、不需要复杂设备,以及可产生适当范围的定向大孔等优点,已成为其它常用技术(如 3D 打印和静电纺丝等)的替代方案^[57]。为了模拟骨骼肌 ECM 结构,Hu 等^[60]采用单向冷冻技术制备了一种基于明胶和聚多巴胺包埋碳纳米管(PCNTs)的三维定向导电冷冻材料,用于骨骼肌组织修复。随着细胞培养肉产业发展,定向冷冻干燥技术也逐渐被应用于细胞培养肉^[61-62]。与其它应用不同,将定向冷冻干燥技术应用于细胞培养肉的主要问题是材料的选择。材料应该具备生物相容性,较大的表面积,无毒、可食用,以及允许培养基最大限度扩散等性质^[63]。Chen 等^[61]通过定向冷冻干燥法将食品级材料,如胶原蛋白水凝胶加工成具有排列多孔结构的支架,将其用来培养猪肌肉干细胞,来生产细胞培养猪肉。据报道,对于肌源性细胞,支架

的最佳孔隙度范围为 30%~90%,最佳孔径为 50~150 μm 或更大^[63]。定向冷冻干燥法制备的胶原蛋白支架的孔隙率为 73.4%,连通性为 90.2%,孔径大小主要集中在 100~150 μm ,这适合猪肌肉干细胞的生长^[61]。胶原蛋白含有丰富的精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸肽(RGD 肽),这有助于细胞黏附。与随机结构的多孔支架相比,具有排列结构的多孔支架可以促进细胞的定向生长和肌管的形成和成熟,有助于细胞培养肉模拟传统肉类特征。除了动物源蛋白材料,一些植物源蛋白成分也被开发,并结合定向冷冻干燥法制备多孔排列支架,用于细胞培养肉的生产^[62]。当然,这种方法也存在一些局限性,如无法制备具有精密结构的支架,无法精准控制不同种类细胞在三维支架中的分布,以及支架机械强度不足。

3.4 微成型技术

微成型(Micromolding)是一种简单、经济、直观的可以制备具有可控特征水凝胶的微加工技术^[49,64]。它是基于水凝胶前体模具的使用,模具的形状和结构决定了水凝胶最终的形状和结构。1988 年,研究人员首次将胚胎鸟类骨骼肌细胞嵌入胶原水凝胶,并利用简单的模具将其培养成高密度、可收缩的肌肉组织^[65]。从那时起,各种模具被开发出来,应用于成肌细胞的排列研究^[24,31,66-69]。天然骨骼肌组织由平行排列的、大小相对相等的多核肌纤维组成,它们被 ECM 包围^[70]。因此,体外模拟骨骼肌组织的关键是获得单轴排列的肌管。通常的方法是将成肌细胞以较高的细胞密度置于 2 个固定点之间的水凝胶中培养,故两端带有锚定结构的简单模具被设计出来(图 5a)^[31,66,71]。这种方法旨在再现体内肌肉骨骼微排列,其特征是通过连接肌腱,将力从肌肉传递到骨骼^[72]。当成肌细胞在水凝胶中生长时,会迅速黏附并开始收缩周围的基质,当基质整体收缩时,锚定的结构则会产生被动的纵向张力,这有助于细胞沿着纵向排列,进而融合形成排列的肌管^[73]。Smith 等^[31]验证了这种方法的有效性,首先制备了一个两端锚定的腔室结构,然后将负载原代大鼠肌肉细胞的胶原蛋白水凝胶浇铸到腔室中,凝胶凝固后,加入培养基进行培养(图 5a I)。诱导分化后,观察到 3D 胶原蛋白构建体中有与凝胶长平面平行排列的多核肌

管,而在 2D 培养中未发现该现象。类似的研究也出现同样的结果^[71,74-75],而大多局限于三维骨骼肌组织工程的研究。近年来,简单模具也被用于细胞培养肉的研究。Lou 等^[76]设计了一种低成本且易于获得的组织模具,结合高细胞生物相容性材料纤维蛋白,制备了具有排列肌管的鱼肌肉组织,利用谷氨酰胺转氨酶交联鱼肌肉组织,形成与真实鱼片结构极为相似的细胞培养鱼片(图 5a III)。简单的模具所需要的材料是灵活的且易获得的,非常适合实验室研究。随着软光刻技术发展,复杂的模具被设计出来,其中聚二甲基硅氧烷(PDMS)是制造模具中最常用的材料。PDMS 模具的多样性和多功能性依赖于计算机辅助设计(CAD)技术的图案设计。为了生成所需结构的水凝胶,水凝胶前体溶液被加入到模具中,随后凝胶化以产生各种形状和大小的结构(图 5b)^[24,67,69,77]。目前,PDMS 模具已被广泛应用于骨骼肌组织工程。Bian 等^[67]报

道了一种细胞/水凝胶微成型方法,来制造含有密集排列肌肉纤维的多孔大鼠骨骼肌组织网络。如图 5b I 所示,PDMS 模具具有一系列精密尺寸的细长柱,可以使细胞/水凝胶构建体形成重复排列的孔隙结构。通过控制微成型网络孔的大小和伸长,来独立控制组织的孔隙度(即代谢供应)和 3D 细胞排列。类似的模型也在细胞培养肉研究中被应用^[24,69]。Zhu 等^[24]利用 PDMS 模具制作了猪肌肉组织网络,并且将这些肌肉组织组装,以获得肉饼和肉丸(图 5b III)。Furuhashi 等^[69]设计了一套 PDMS 模具(图 5b II),通过积累培养负载牛成肌细胞的水凝胶模块,制造了毫米厚的牛肌肉组织。相较于简单的模具,PDMS 模具具有更为精密的尺寸,然而也需要更复杂的技术和设备支持。除了 PDMS,聚甲基丙烯酸甲酯、硅胶、聚四氟乙烯、玻璃和其它生物聚合物也常用于生产微模具^[73,78-79]。

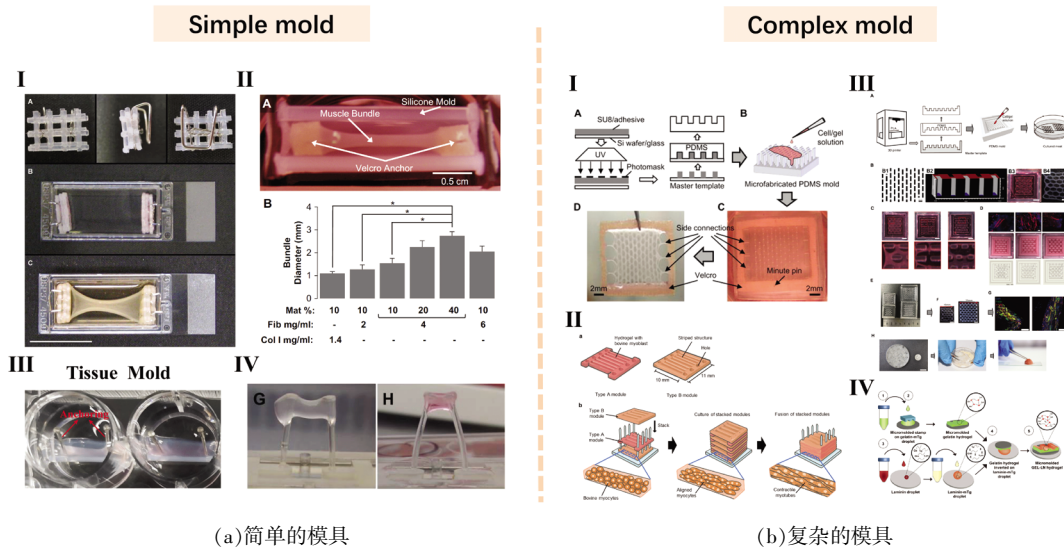


图 5 用于成肌细胞排列的微成型技术^[24,31,66-69,75-76]

Fig.5 Micromolding technique for myoblast alignment^[24,31,66-69,75-76]

3.5 微图案技术

随着材料科学技术的发展,用于培养细胞的图案化技术开始出现。细胞图案化的形成主要分为两类:一类是在基底的图案区域修饰可供细胞黏附的物质,使细胞选择性地生长,形成图案;另一类是利用空间限制使细胞在图案化的区域中生长。利用这两种原理,各种图案化技术相继出现。

对于细胞的三维培养,后一种图案化技术常被使用,其中包括光掩模(Photomask)和微针技术(Microneedle technique)等^[80]。其中,由于制备工艺的简单性,光掩模得到了很好的应用发展。光掩模,也称为光刻技术,是通过将光敏材料涂覆在基底上(一般由玻璃、塑料板或者石英作为基底),并利用微图案光掩模版进行光照射,可得到带有微图

案的结构体。该方法通常需要紫外光源、光敏材料和光掩模版。光掩模可直接将负载细胞的光敏材料形成具有微图案的水凝胶。同时若不负载细胞,形成的具有微图案的水凝胶可作为模具使用,适用多种场景的细胞三维培养。

3.6 其它材料加工技术

还有一些其它的支架加工技术也被用来生产具有仿生结构的细胞培养肉,例如:脱细胞支架技术等。脱细胞支架技术是一种通过化学、物理和生物方法去除动物、植物或微生物组织中的细胞获得胞外物质的技术。目前,脱细胞植物支架因低成本、可食用、来源广泛等优点,广泛应用于细胞培养肉的生产^[20,81-82]。Jones等^[20]利用菠菜叶制备脱细胞菠菜叶支架,并用其成功培养了牛肌卫星细胞。先前研究显示,不同植物物种有不同的表面地形,这些地形线索可以指导细胞生长和分化^[83]。值得注意的是,脱细胞菠菜叶支架表面的局部地形线索可以促进细胞排列,有助于创建有组织的肌肉结构^[20]。

4 结语

细胞培养肉是一种以可持续方式生产的肉类产品,有助于缓解因传统畜牧业和传统渔业所带来的环境污染、动物福利以及卫生等问题。为开发细胞培养肉的支架,应采用组织工程技术为细胞提供适当的黏附、增殖和分化生态位,使细胞在体外培养时,可以模拟体内生长过程。本文总结了有利于形成排列肌管的生物支架材料的制造方法,细胞在支架上以细长的形态定向生长并分化形成排列的肌管。这有利于为细胞培养肉提供必要的质地和感官特性,使细胞培养肉能更大程度被消费者接受,走上餐桌。

参 考 文 献

- [1] HAVLÍK P, VALIN H, HERRERO M, et al. Climate change mitigation through livestock system transitions[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(10): 3709-3714.
- [2] GODFRAY H C J, AVEYARD P, GARNETT T, et al. Meat consumption, health, and the environment[J]. *Science*, 2018, 361(6399): eaam5324.
- [3] LEVI S, YEN F C, BARUCH L, et al. Scaffolding technologies for the engineering of cultured meat: Towards a safe, sustainable, and scalable production[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2022, 126: 13-25.
- [4] SCHMIDT J W, VIKRAM A, DOSTER E, et al. Antimicrobial resistance in US retail ground beef with and without label claims regarding antibiotic use[J]. *Journal of Food Protection*, 2021, 84(5): 827-842.
- [5] LI W W, PIRES S M, LIU Z T, et al. Surveillance of foodborne disease outbreaks in China, 2003-2017[J]. *Food Control*, 2020, 118: 107359.
- [6] 尤晓颜, 李亚春, 段续. 人造肉生产工艺及其研究进展[J]. *食品与机械*, 2024, 40(6): 221-226, 240. YOU X Y, LI Y C, DUAN X. Research progress in manufacturing technique of artificial meat[J]. *Food & Machinery*, 2024, 40(6): 221-226, 240.
- [7] 李丹羿, 徐涵, 赵晓雨, 等. 细胞培养肉的发展现状和挑战[J]. *农业生物技术学报*, 2023, 31(1): 165-171. LI D Y, XU H, ZHAO X Y, et al. Recent developments and future challenges of cultured meat[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2023, 31(1): 165-171.
- [8] WARNER R D. Review: Analysis of the process and drivers for cellular meat production[J]. *Animal*, 2019, 13(12): 3041-3058.
- [9] ZHANG G Q, ZHAO X R, LI X L, et al. Challenges and possibilities for bio-manufacturing cultured meat[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2020, 97: 443-450.
- [10] BOMKAMP C, SKAALURE S C, FERNANDO G F, et al. Scaffolding biomaterials for 3D cultivated meat: Prospects and challenges[J]. *Advanced Science*, 2022, 9(3): e2102908.
- [11] POST M J. An alternative animal protein source: cultured beef[J]. *Frontiers in Agricultural Sustainability: Studying the Protein Supply Chain to Improve Dietary Quality*, 2014, 1328: 29-33.
- [12] MIRAMONTES E, KEMPISTY B, PETITTE J, et al. Myogenic response to increasing concentrations of ammonia differs between mammalian, avian, and fish species: Cell differentiation and genetic study[J]. *Genes*, 2020, 11(8): 840.

- [13] O'NEILL E N, COSENZA Z A, BAAR K, et al. Considerations for the development of cost-effective cell culture media for cultivated meat production[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2021, 20(1): 686-709.
- [14] KOLKMANN A M, POST M J, RUTJENS M A M, et al. Serum-free media for the growth of primary bovine myoblasts[J]. *Cytotechnology*, 2020, 72(1): 111-120.
- [15] KUO H H, GAO X Z, DEKEYSER J M, et al. Negligible-cost and weekend-free chemically defined human iPSC culture[J]. *Stem Cell Reports*, 2020, 14(2): 256-270.
- [16] BODIOU V, MOUTSATSOU P, POST M J. Microcarriers for upscaling cultured meat production[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2020, 7: 10.
- [17] HANGA M P, ALI J, MOUTSATSOU P, et al. Bioprocess development for scalable production of cultivated meat[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2020, 117(10): 3029-3039.
- [18] NG S, KURISAWA M. Integrating biomaterials and food biopolymers for cultured meat production[J]. *Acta Biomaterialia*, 2021, 124: 108-129.
- [19] CHEN Y, LI L Z, CHEN L, et al. Gellan gum-gelatin scaffolds with Ca²⁺ crosslinking for constructing a structured cell cultured meat model[J]. *Biomaterials*, 2023, 299: 122176.
- [20] JONES J D, REBELLO A S, GAUDETTE G R. Decellularized spinach: An edible scaffold for laboratory-grown meat[J]. *Food Bioscience*, 2021, 41: 100986.
- [21] BEN-ARYE T, SHANDALOV Y, BEN-SHAUL S, et al. Textured soy protein scaffolds enable the generation of three-dimensional bovine skeletal muscle tissue for cell-based meat[J]. *Nature Food*, 2020, 1(4): 210-220.
- [22] BENJAMINSON M A, GILCHRIST J A, LORENZ M. Edible muscle protein production system (MPPS): Stage 1, fish[J]. *Acta Astronautica*, 2002, 51(12): 879-889.
- [23] POST M J. Cultured beef: Medical technology to produce food[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2014, 94(6): 1039-1041.
- [24] ZHU H Z, WU Z Y, DING X, et al. Production of cultured meat from pig muscle stem cells[J]. *Biomaterials*, 2022, 287: 121650.
- [25] NICOLA J. Lab-grown meat the science of turning cells into steaks and nuggets[J]. *Nature*, 2023, 619: 22-24.
- [26] FRAEYE I, KRATKA M, VANDENBURGH H, et al. Sensorial and nutritional aspects of cultured meat in comparison to traditional meat: Much to be inferred[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2020, 7: 35.
- [27] LIU J J, HOCQUETTE E, ELLIES-OURY M P, et al. Chinese consumers' attitudes and potential acceptance toward artificial meat[J]. *Foods*, 2021, 10(2): 353.
- [28] LISTRAT A, LEBRET B, LOUVEAU I, et al. How muscle structure and composition influence meat and flesh quality[J]. *Scientific World Journal*, 2016, 2016: 3182746.
- [29] 刘业学, 王稳航. 从肌肉的组织结构和生成机制探讨“人造肉”开发的仿生技术[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(8): 295-307.
- LIU Y X, WANG W H. Discussion on the bioinspiration technology of 'artificial meat' from the structure and growth mechanism of muscles[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2020, 20(8): 295-307.
- [30] LIAO H, ZHOU G Q. Development and progress of engineering of skeletal muscle tissue[J]. *Tissue Engineering Part B-Reviews*, 2009, 15(3): 319-331.
- [31] SMITH A S, PASSEY S, GREENSMITH L, et al. Characterization and optimization of a simple, repeatable system for the long term *in vitro* culture of aligned myotubes in 3D[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2012, 113(3): 1044-1053.
- [32] SMOAK M M, MIKOS A G. Advances in biomaterials for skeletal muscle engineering and obstacles still to overcome[J]. *Materials Today Bio*, 2020, 7: 100069.
- [33] FERNÁNDEZ-COSTA J M, FERNÁNDEZ-GARIBAY X, VELASCO-MALLORQUÍ F, et al. Bioengineered skeletal muscles as new tools for muscular dystrophies preclinical studies[J/OL]. *Journal of Tissue Engineering*. (2021-02-01)[2025-02-10]. <https://doi.org/10.1177/2041731420981339>.
- [34] HANDRAL H K, HUA TAY S, WAN CHAN W, et al. 3D Printing of cultured meat products[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2022, 62(1): 272-281.
- [35] KACAREVIC Z P, RIDER P M, ALKILDANI S, et

- al. An introduction to 3D bioprinting: Possibilities, challenges and future aspects[J]. *Materials*, 2018, 11(11): 2199.
- [36] BLAESER A, CAMPOS D F D, FISCHER H. 3D bioprinting of cell-laden hydrogels for advanced tissue engineering [J]. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, 2017, 2: 58–66.
- [37] GUNGOR-OZKERIM P S, INCI I, ZHANG Y S, et al. Bioinks for 3D bioprinting: An overview [J]. *Biomaterials Science*, 2018, 6(5): 915–946.
- [38] CHOI Y J, KIM T G, JEONG J, et al. 3D Cell printing of functional skeletal muscle constructs using skeletal muscle-derived bioink [J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2016, 5(20): 2636–2645.
- [39] DESSAUGE F, SCHLEDER C, PERRUHOT M H, et al. 3D *in vitro* models of skeletal muscle: Myosphere, myobundle and bioprinted muscle construct [J]. *Veterinary Research*, 2021, 52(1): 72.
- [40] DUAN B, HOCKADAY L A, KANG K H, et al. 3D Bioprinting of heterogeneous aortic valve conduits with alginate/gelatin hydrogels [J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2013, 101(5): 1255–1264.
- [41] SEOL Y J, KANG H W, LEE S J, et al. Bioprinting technology and its applications [J]. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 2014, 46(3): 342–348.
- [42] LIU D H, XU E B, NIU R H, et al. Tissue-like cultured fish fillets through a synthetic food pipeline [J]. *Npj Science of Food*, 2023, 7(1): 17.
- [43] NIU R H, XIN Q P, LAO J H, et al. Topological polymeric glucosyl nanoaggregates in scaffold enable high-density piscine muscle tissue [J]. *Biomaterials*, 2024, 314: 122819.
- [44] KANG D H, LOUIS F, LIU H, et al. Engineered whole cut meat-like tissue by the assembly of cell fibers using tendon-gel integrated bioprinting [J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 5059.
- [45] JEONG D, SEO J W, LEE H G, et al. Efficient myogenic/adipogenic transdifferentiation of bovine fibroblasts in a 3D bioprinting system for steak-type cultured meat production [J]. *Advanced Science*, 2022, 9(31): e2202877.
- [46] JIN X, LEE J S, KWAK S, et al. Myogenic differentiation of p53- and Rb-deficient immortalized and transformed bovine fibroblasts in response to myoD [J]. *Molecules and Cells*, 2006, 21(2): 206–212.
- [47] YIN J L, JIN X, BECK S, et al. *In vitro* myogenic and adipogenic differentiation model of genetically engineered bovine embryonic fibroblast cell lines [J]. *Biotechnology Letters*, 2010, 32(2): 195–202.
- [48] JO B, NIE M, TAKEUCHI S. Manufacturing of animal products by the assembly of microfabricated tissues [J]. *Essays In Biochemistry*, 2021, 65(3): 611–623.
- [49] VOLPI M, PARADISO A, COSTANTINI M, et al. Hydrogel-based fiber biofabrication techniques for skeletal muscle tissue engineering [J]. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2022, 8(2): 379–405.
- [50] SOMERS S M, ZHANG N Y, MORRISSETTE-MCALMON J B F, et al. Myoblast maturity on aligned microfiber bundles at the onset of strain application impacts myogenic outcomes [J]. *Acta Biomaterialia*, 2019, 94: 232–242.
- [51] OSTROVIDOV S, SHI X T, ZHANG L, et al. Myotube formation on gelatin nanofibers – Multi-walled carbon nanotubes hybrid scaffolds [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(24): 6268–6277.
- [52] 董齐, 熊思雨, 周应山, 等. 生物医用纤维材料制造技术进展及应用研究 [J]. *纺织科学研究*, 2024(11): 12–22.
- DONG Q, XIONG S Y, ZHOU Y S, et al. Research on manufacturing technology and application of biomedical fiber materials [J]. *Textile Scientific Research*, 2024(11): 12–22.
- [53] UEHARA T M, PAINO I M M, SANTOS F A, et al. Fabrication of random and aligned electrospun nanofibers containing graphene oxide for skeletal muscle cells scaffold [J]. *Polymers for Advanced Technologies*, 2020, 31(6): 1437–1443.
- [54] LANGELAAN M L P, BOONEN K J M, POLAK R B, et al. Meet the new meat: Tissue engineered skeletal muscle [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2010, 21(2): 59–66.
- [55] YEO M, KIM G H. Anisotropically aligned cell-laden nanofibrous bundle fabricated via cell electrospinning to regenerate skeletal muscle tissue [J]. *Small*, 2018, 14(48): 1803491.
- [56] GLUSAC J, FISHMAN A. Enzymatic and chemical modification of zein for food application [J]. *Trends in*

- Food Science & Technology, 2021, 112: 507–517.
- [57] DIAZ F, FORSYTH N, BOCCACCINI A R. Aligned ice templated biomaterial strategies for the musculoskeletal system[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2023, 12(21): 202203205.
- [58] SHAO G F, HANAOR D A H, SHEN X D, et al. Freeze casting: From low-dimensional building blocks to aligned porous structures—a review of novel materials, methods, and applications[J]. *Advanced Materials*, 2020, 32(17): 1907176.
- [59] LIU R P, XU T T, WANG C A. A review of fabrication strategies and applications of porous ceramics prepared by freeze-casting method [J]. *Ceramics International*, 2016, 42(2): 2907–2925.
- [60] HU T L, SHI M T, ZHAO X, et al. Biomimetic 3D aligned conductive tubular cryogel scaffolds with mechanical anisotropy for 3D cell alignment, differentiation and *in vivo* skeletal muscle regeneration[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2022, 428: 131017.
- [61] CHEN Y C, ZHANG W H, DING X, et al. Programmable scaffolds with aligned porous structures for cell cultured meat[J]. *Food Chemistry*, 2024, 430: 137098.
- [62] XIANG N, YUEN J J S K, STOUT A J, et al. 3D porous scaffolds from wheat glutenin for cultured meat applications[J]. *Biomaterials*, 2022, 285: 121543.
- [63] NURUL ALAM A M M, KIM C J, KIM S H, et al. Scaffolding fundamentals and recent advances in sustainable scaffolding techniques for cultured meat development[J]. *Food Research International*, 2024, 189: 114549.
- [64] KHADEMHOSEINI A, LANGER R. Microengineered hydrogels for tissue engineering[J]. *Biomaterials*, 2007, 28(34): 5087–5092.
- [65] VANDENBURGH H H, KARLISCH P, FARR L. Maintenance of highly contractile tissue-cultured avian skeletal myotubes in collagen gel[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 1988, 24(3): 166–174.
- [66] HINDS S, BIAN W, DENNIS R G, et al. The role of extracellular matrix composition in structure and function of bioengineered skeletal muscle[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(14): 3575–3583.
- [67] BIAN W N, BURSAC N. Engineered skeletal muscle tissue networks with controllable architecture[J]. *Biomaterials*, 2009, 30(7): 1401–1412.
- [68] CHEN Y C, BASSEY A P, ZHU H Z, et al. Fabrication of cell cultured meat by hydrogel with topographic microstructures[J]. *Food Bioscience*, 2023, 55: 102910.
- [69] FURUHASHI M, MORIMOTO Y, SHIMA A, et al. Formation of contractile 3D bovine muscle tissue for construction of millimetre-thick cultured steak[J]. *Npj Science of Food*, 2021, 5(1): 6.
- [70] AHMAD K, LIM J H, LEE E J, et al. Extracellular matrix and the production of cultured meat[J]. *Foods*, 2021, 10(12): 3116.
- [71] JONES J M, PLAYER D J, MARTIN N R W, et al. An assessment of myotube morphology, matrix deformation, and myogenic mRNA expression in custom-built and commercially available engineered muscle chamber configurations[J]. *Frontiers in Physiology*, 2018, 9: 483.
- [72] LI Y H, HUANG G Y, ZHANG X H, et al. Engineering cell alignment *in vitro* [J]. *Biotechnology Advances*, 2014, 32(2): 347–365.
- [73] CHEN Z W, ZHAO R G. Engineered tissue development in biofabricated 3D geometrical confinement—a review[J]. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2019, 5(8): 3688–3702.
- [74] MARTIN N R, PASSEY S L, PLAYER D J, et al. Factors affecting the structure and maturation of human tissue engineered skeletal muscle[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(23): 5759–5765.
- [75] CHIRON S, TOMCZAK C, DUPERRAY A, et al. Complex interactions between human myoblasts and the surrounding 3D fibrin-based matrix [J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e36173.
- [76] LOU H H, LU H Y, ZHANG S L, et al. Highly aligned myotubes formation of piscine satellite cells in 3D fibrin hydrogels of cultured meat[J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 282(Pt 2): 136879.
- [77] COSTANTINI M, TESTA S, FORNETTI E, et al. Engineering muscle networks in 3D gelatin methacryloyl hydrogels: Influence of mechanical stiffness and geometrical confinement[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2017, 5: 22.
- [78] LEIJTEN J, SEO J, YU K, et al. Spatially and temporally controlled hydrogels for tissue engineering [J]. *Materials Science & Engineering R—Reports*, 2017, 119: 1–35.

- [79] NEAL D, SAKAR M S, ONG L L S, et al. Formation of elongated fascicle-inspired 3D tissues consisting of high-density, aligned cells using sacrificial outer molding[J]. *Lab on a Chip*, 2014, 14(11): 1907–1916.
- [80] MOEINZADEH S, JABBARI E. 3D Cell culture in micropatterned hydrogels prepared by photomask, microneedle, or soft lithography techniques [M]// KOLEDOVA Z. *3D Cell Culture: Methods and Protocols*, New York: Humana Press, 2017: 239–252.
- [81] THYDEN R, PERREAULT L R, JONES J D, et al. An edible, decellularized plant derived cell carrier for lab grown meat[J]. *Applied Sciences–Basel*, 2022, 12(10): 5155.
- [82] HONG T K, DO J T. Generation of chicken contractile skeletal muscle structure using decellularized plant scaffolds[J]. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2024, 10(5): 3500–3512.
- [83] FONTANA G, GERSHLAK J, ADAMSKI M, et al. Biofunctionalized plants as diverse biomaterials for human cell culture[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2017, 6(8): 1601225.

The Scaffold Manufacturing Technologies of Cultured Meat Based on Myotubes Directional Alignment

LOU Hanghang¹, ZHANG Shengliang¹, SHI Ying¹, CHEN Qihe^{1,2*}

¹College of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058

²Innovation Center of Yangtze River Delta, Zhejiang University, Jiaxing 314100, Zhejiang)

Abstract Cultured meat technology holds great promise and can help address the sustainability and environmental challenges faced by traditional livestock husbandry. Unlike other alternative proteins, cultured meat is made from animal stem cells cultured *in vitro* and is the closest product to natural meat. To make cultured meat have the sensory and nutritional characteristics of conventional meat as much as possible, researchers have conducted extensive studies on scaffold characteristics and manufacturing techniques, with the aim of replicating the properties of natural muscle tissue. This review summarizes the methods for preparing edible scaffolds, with the aim of producing tissue-like cultured meat with aligned myotubes. Firstly, the composition and structure of animal-derived meat are analyzed. And, based on the structural properties of natural muscle tissue, the main considerations for the design of scaffolds for cultured meat engineering are elaborated, with the formation of uniaxially aligned myotubes as the key focus. Secondly, the main scaffold techniques suitable for generating aligned myotubes and their current applications in cultured meat engineering are summarized. Finally, the future development prospects are outlined.

Keywords cultured meat; alternative protein; directional muscle cell growth; myotube alignment; scaffold