

Uitdagingen en mogelijkheden voor de bioproductie van kweekvlees

Hoogtepunten

- Kweekvlees wordt geproduceerd door *in vitro* teelt van dierlijke cellen, in plaats van veeteelt en slachten.
- Gekweekt vlees is naar voren gekomen als een onderzoeksfocus in cellulaire landbouw vanwege de vele potentiële voordelen ervan.
- De laatste ontwikkelingen in kweekvlees worden samengevat en mogelijke strategieën om de huidige uitdagingen aan te gaan worden besproken.
- De toepassing van bioreactor-engineering en synthetische biogietechnieken in de commercialisering van gekweekt vlees wordt voorgesteld.

Abstract

Achtergrond

Kweekvlees is naar voren gekomen als een baanbrekende technologie voor de wereldwijde voedingsindustrie, die werd beschouwd als een mogelijke oplossing om in de nabije toekomst ernstige milieu-, duurzaamheids-, wereldwijde volksgezondheids- en dierenwelzijnsproblemen te verminderen. Hoewel er de belofte is dat kweekvlees conventioneel vlees kan aanvullen of zelfs vervangen, moeten er in de vroege stadia nog veel uitdagingen worden opgelost.

Reikwijdte en aanpak

In deze review hebben we ons gericht op de kenmerken van kweekvlees en hebben we de huidige technologische uitdagingen en hun mogelijke oplossingen samengevat op basis van weefsel- en bioreactortechnologie, voedingswetenschap en materiaalwetenschap voor het bereiden van stamcellen, het optimaliseren van kweekomstandigheden en het ontwikkelen van kosteneffectieve kweek media, bioreactorontwerpen en voedselverwerkingssystemen.

Belangrijkste bevindingen en conclusies

Met snelle vooruitgang op het gebied van weefsel- en bioreactortechnologie zijn nieuwe technologieën voor het kweken van vlees ontwikkeld en de afgelopen jaren is er aanzienlijke vooruitgang geboekt. Omdat onderzoek naar kweekvlees intrinsiek complex is, is het echter noodzakelijk om in de toekomst de integratie van multidisciplinair onderzoek op dit gebied te stimuleren. We stellen enkele innovatieve benaderingen voor, zoals de toepassingen van synthetische biologie en bioreactor-engineering. Deze strategieën zullen nuttig zijn om kweekvlees op te schalen in toekomstige toepassingen.

Trefwoorden
Kweekvlees
Weefseltechniek
Cel cultuur
Serumvrije cultuur
Bioreactor
Synthetische biologie

1 . Invoering

De term "kweekvlees", ook beschreven als *in vitro* , synthetisch of in het laboratorium gekweekt vlees, verwijst naar vlees geproduceerd in een bioreactor met tissue engineering-technologie ([Bhat & Fayaz, 2011](#) ; [Stephens et al., 2018](#) ; [Tiberius, Borning, & Seeler, 2019](#)). In tegenstelling tot conventioneel vlees, belooft kweekvlees financiële problemen, dierenwelzijnsethiek, hulpbronnentekorten en volksgezondheidskwesties aan te pakken ([Bhat, Kumar, & Bhat, 2017](#) ; [Stephens et al., 2018](#)).

Het idee van kweekvlees als alternatief voor conventioneel vlees werd oorspronkelijk bedacht door Frederick Edwin Smith en Winston Churchill in de jaren dertig ([Arshad et al., 2017](#)). Een laboratoriumonderzoek van gekweekt vlees werd voor het eerst ontworpen door de National Aeronautics and Space Administration (NASA) in de vroege jaren 2000, met als doel myoblasten in suspensiecultuur te laten groeien als een duurzaam toevoersysteem voor ruimtevluchten en ruimtestations op lange termijn ([Benjaminson, Gilchrist, & Lorenz, 2002](#) ; [Wolfson, 2002](#)).

In de afgelopen jaren hebben vorderingen van weefselmanipulatie in de regeneratieve geneeskunde wetenschappers geholpen spierweefsel te verkrijgen uit een deel van levende monsters met celculturen, wat de weg vrijmaakte voor *in vitro* vleesproductie ([Arshad et al., 2017](#) ; [Bhat & Bhat, 2011b](#) ; [Vein, 2006](#)). Het is praktisch om skeletspierweefsel-engineering, stamcellen, celculturen en weefselkweekmethoden te gebruiken voor het kweken van vlees *in vitro* , die allemaal veeproblemen zoals schade aan dieren en milieuvervuiling voorkomen. Het bekende prototype van *in vitro* vleespasteitje is in 2013 ontwikkeld door farmacoloog Dr. Mark Post en het leek op conventioneel vlees. Dit evenement wekte de verwachtingen van het publiek voor kweekvlees als vleesvervanger ([O'Riordan, Fotopoulou, & Stephens, 2017](#) ; [Post, 2014](#)). Destijds duurde het echter ongeveer drie maanden en meer dan \$ 330.000 om de vijf-ounce vleespasteitje in een laboratorium te kweken. De productie van gekweekt vlees bevindt zich inderdaad nog in de beginfase en beperkende factoren van hoge kosten en inefficiënte technologie blijven, waardoor de toepassing en commercialisering ervan worden geblokkeerd ([Post, 2012](#) ; [Stephens et al., 2018](#)). Om kweekvlees te adopteren, is het belangrijk om de vereiste sleutelkwaliteiten van conventioneel vlees na te bootsen, zoals uiterlijk, geur, textuur en smaak. Deze review richt zich op de voordelen en

ontwikkeling van kweekvlees, bespreekt de technische uitdagingen en suggereert mogelijke strategieën voor het aanpakken van problemen bij de productie van kweekvlees.

2 . Voordelen van kweekvlees

2.1 . Dierenleed verlichten

Volgens de recent bijgestelde prognose van de Voedsel- en Landbouworganisatie (FAO) zal de vraag naar vlees tegen 2050 tot 70% toenemen, wat een enorme uitdaging zal zijn voor de veehouderij ([Gerber et al., 2013](#)). Als alternatief beloven kweekvleesproductiesystemen *in vitro* vlees/eiwit te leveren om aan de wereldwijde vraag te voldoen, wat het slachten van miljoenen voedseldieren zou verminderen ([Bhat & Bhat, 2011a](#) ; [Webster, 2002](#)). In theorie kan elke oudercel die betrokken is bij de productie van gekweekt vlees zich vele malen vermenigvuldigen. Het aantal dieren dat nodig is voor weefselmonsters is dus kleiner dan voor conventionele vleesproductie in ordes van grootte, wat een veelbelovende aanpak zou kunnen zijn om dierenleed te verlichten.

2.2 . Gezondheid en veiligheid

De veehouderijsystemen voor conventionele vleesproductie brengen het risico van dierziekten, epidemieën en misbruik van antibiotica met zich mee ([Bhat & Bhat, 2011a](#) ; [Webster, 2002](#)). In plaats daarvan zal kweekvlees veilige en gematigde concentraties conserveermiddelen zoals natriumbenzoaat gebruiken om het groeiende vlees te beschermen tegen microben ([Seman, Quickert, Borger, & Meyer, 2008](#)). Bovendien zijn er online monitoringsystemen om de kwaliteit van kweekvlees te analyseren en voedselveiligheidsgarantietechnologie te bieden met een lage kans op bacteriële besmetting tijdens het productieproces. De kwaliteit van kweekvlees kan worden geoptimaliseerd door middel van een gecontroleerd kweekstelsel en nabewerking, zoals de verhouding van de samenstelling, het gehalte aan voedingsstoffen, de smaak en de smaak ([Bhat & Bhat, 2011a](#)).

2.3 . Duurzaamheid en milieu

Bij traditioneel vee wordt slechts 5%-25% van het dier verwerkt als eetbaar vlees, wat resulteert in een lage conversieratio voor conventionele vleesproductie ([Alexander, 2011](#) ; [Bhat & Bhat, 2011a](#)). Het brengt een reeks problemen met zich mee met een aanzienlijk deel van de uitstoot van broeikasgassen, landgebruik en water- en energieverbruik ([Bellarby et al., 2013](#) ; [FAO, 2006](#) ; [Gerber et al., 2013](#)). Vergeleken met de meeste conventioneel geproduceerde Europese vleesveesystemen, is aangetoond dat kweekvlees ongeveer 78%–96% minder uitstoot van broeikasgassen, 99% minder landgebruik en 82%–96% minder waterverbruik met zich meebrengt

([Mattick, Landis, Allenby , & Genovese, 2015](#) ; [Tuomisto & Teixeira de Mattos, 2011](#)). Kweekvlees is in potentie een duurzame en milieuvriendelijke manier om vlees te produceren, omdat het efficiënt kan worden verkregen zonder dat andere ondersteunende weefsels en functionele structuren zoals het skelet en het spijsverteringsstelsel hoeven te worden ontwikkeld, zodra de technologie voldoende is gevorderd. Ondanks het vroege ontwikkelingsstadium met technische uitdagingen en acceptatie door de consument, zoals het ontbreken van kosteneffectieve en hulpbronnefficiënte methoden voor opschaling, wordt gespeculeerd dat de algehele energiebalans zal omslaan in het voordeel van kweekvlees wanneer indirecte kosten en milieuvoordelen in aanmerking genomen ([Bhat, Kumar, & Fayaz, 2015](#) ; [Tuomisto, 2019](#)). Over het algemeen is kweekvlees in potentie een duurzame en milieuvriendelijke manier om vlees te produceren om de stress van een groeiende bevolking te verlichten en aan de vraag naar vlees te voldoen.

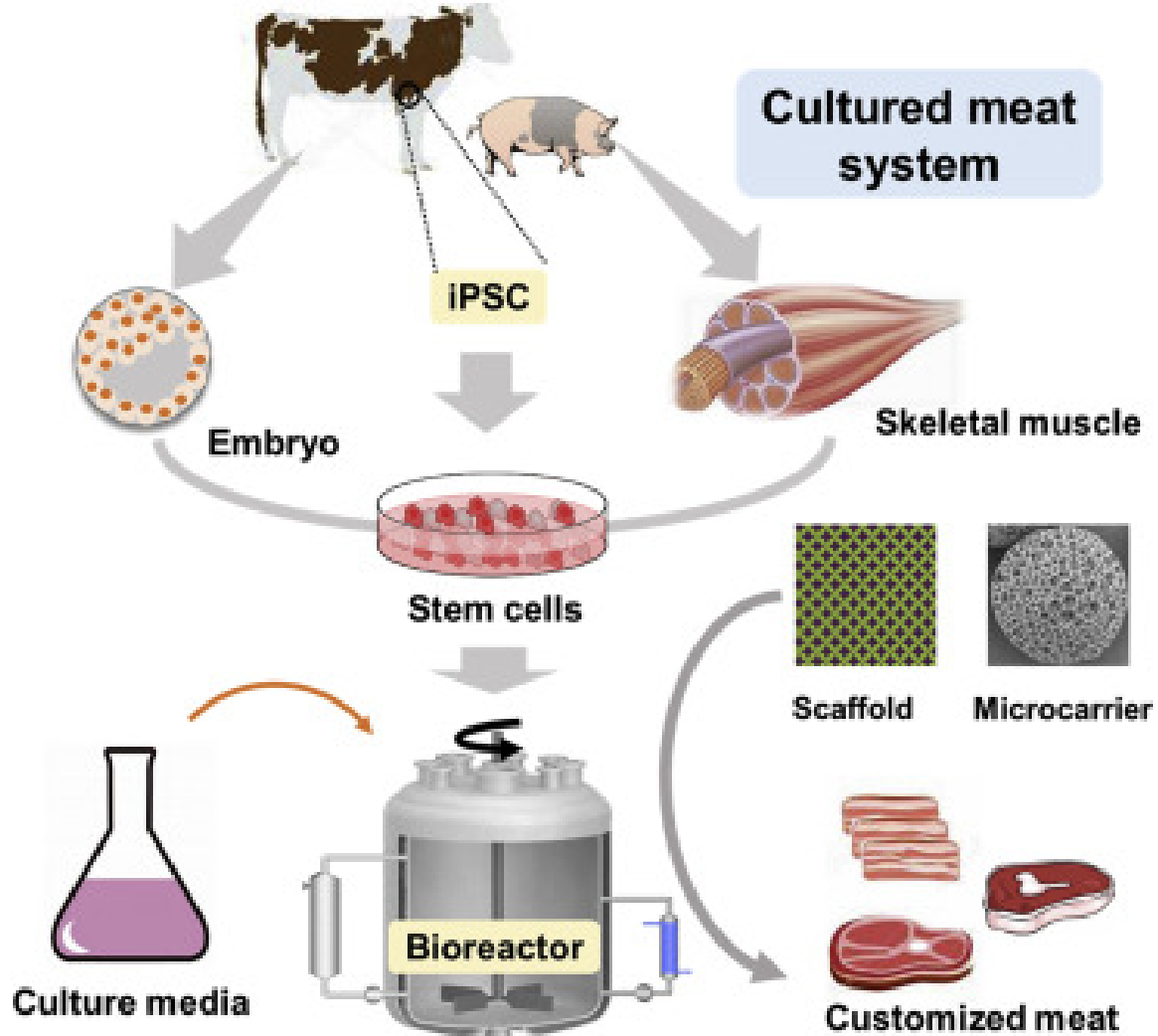
3 . Technische uitdagingen bij het produceren van kweekvlees

3.1 . Mobiele bronnen

De technologie voor dierlijk weefselkweek begon oorspronkelijk in de jaren negentig en werd gebruikt om celproliferatie en metabolisme te bestuderen ([Ebeling, 1914](#)). Op dit moment is het onderzoek naar weefseltechnologie bij dieren grotendeels gericht op biologie en geneeskunde, zoals regeneratieve geneeskunde, geneesmiddelenontwikkeling en toxicologisch onderzoek. Voor kweekvlees zijn mogelijk geen strikte voorschriften vereist zoals die vereist zijn voor celculturen in medisch onderzoek, aangezien de zuiverheid van de grondstoffen die nodig zijn voor kweekvlees niet zo hoog is als voor biomedische toepassingen. Daarom is het belangrijk om een efficiënte, veilige en grootschalige productie van kweekvlees te ontwikkelen om de productiekosten effectief te verlagen ([Arshad et al., 2017](#)).

Een van de uitdagingen voor de productie van kweekvlees is de selectie van een geschikte celbron voor de dierlijke weefselkweek ([Post, 2012](#)). De belangrijkste uitdaging in weefselkweek voor kweekvlees is het verkrijgen van een voldoende groot aantal homogene startcellen om effectieve proliferatie en differentiatie uit te voeren. In de afgelopen decennia zijn verschillende stamceltypen geïdentificeerd en de bijbehorende technologie is aanzienlijk gevorderd. Op dit moment zijn er verschillende celbronnen toegepast op tissue engineering. Een bron zijn de oorspronkelijke weefsels of cellijnen. Mutaties worden vervolgens geïnduceerd door middel van genetische manipulatie of chemische methoden, wat resulteert in onbeperkte celproliferatie ([Ramboer et al., 2014](#)). Deze continu prolifererende cellen kunnen de afhankelijkheid van verse weefselmonsters verminderen en de snelheid van celproliferatie en differentiatie verhogen. Er zijn echter ook enkele problemen die verband houden met cellijnen die zijn afgeleid van stamcellen, waaronder genetische instabiliteit

en fenotypische drift. Genetische en fenotypische instabiliteit van de cellijn, samen met verkeerde identificatie en besmetting met micro-organismen, zijn een van de verschillende problemen die de celcultuur blijven beïnvloeden ([Geraghty et al., 2014](#)). Een andere bron zijn stamcellen die zijn geïsoleerd uit weefsels, zoals embryonale stamcellen, spierstamcellen en mesenchymale stamcellen ([Fig. 1](#)) ([Stern-Straeter et al., 2014](#)). Spierstamcellen (satellietcellen) ([Mauro, 1961](#)) worden het meest gebruikt in onderzoek naar kweekvlees vanwege hun potentieel voor differentiatie. Deze cellen kunnen differentiëren tot specifieke cellen door middel van chemische, biologische of mechanische stimulatie tijdens het proliferatieproces ([Post, 2012](#)). Hoewel theoretisch verschillende stamcellijnen onbeperkt kunnen groeien nadat ze zijn vastgesteld, heeft de accumulatie van celmutaties tijdens het proliferatieproces vaak invloed op het amplificatievermogen van weefselculturen, wat leidt tot de beëindiging van celveroudering ([Amit et al., 2000](#)).



Afb. 1 . **Productiestroomschema van gekweekt vlees.** Stamcellen verkregen uit spierweefsel, embryo's of geïnduceerde somatische cellen worden eerst geëxpandeerd en vervolgens geïnduceerd voor differentiatie tot spiercellen. Deze cellen worden verder gekweekt in een bioreactor om hun aantal te vergroten. Vervolgens worden steigers of microdragers geïntroduceerd om deze cellen te laten groeien tot specifieke spiervezels en

grotere weefsels. Figurelementen aangepast van gepubliceerd artikel [Tuomisto HL \(2019\) EMBO Rep. 20\(1\): e47395.](#)

Om celbronnen verder uit te breiden, heeft onderzoek naar het transformeren van somatische cellen in geïnduceerde pluripotente stamcellen (iPSC) ook aandacht gekregen. iPSC's zijn gedifferentieerde cellen en worden pluripotent gemaakt door stabiele transfectie met een reeks specifieke transcriptiefactoren die embryonale genexpressieprogramma's in de cel aansturen (K. [Takahashi & Yamanaka, 2006](#)). Stamcellen kunnen dus effectief worden voorbereid om massacele proliferatie te bereiken ([Bogliotti et al., 2018](#); [Wu & Hochedlinger, 2011](#)). Onlangs zijn er verschillende strategieën voorgesteld voor het genereren van veilige iPSC's zonder enige genomische modificatie. Deze hebben betrekking op het type somatische cellen voor herprogramming, variaties van de herprogrammeergenen en herprogrammeringsmethoden. Dit is een relatief veelbelovende maar uitdagende technologie voor de productie van kweekvles, afgeleid van iPSC's.

3.2 . Proliferatie en differentiatie

De ontwikkeling van stamcellen en tissue engineering biedt de mogelijkheid tot grootschalige productie van kweekvles ([Cravero et al., 2015](#); L.; [Zhao et al., 2017](#)). Kweekvles vereist een groot aantal gedifferentieerde spiercellen om weefsels te vormen. Studies hebben aangetoond dat het mogelijk is om gezonde cellen te behouden door verse voedingsstoffen aan te bieden, terwijl celpassage of celdeling vereist is om cellen in exponentiële groei te houden ([Masters & Stacey, 2007](#)). De meeste cellen hebben echter een beperkte capaciteit voor deling, bekend als de Hayflick-limiet, die grootschalige kweken van spierweefsel in een laboratorium beperkt. Er is nog een effectieve manier om de proliferatie te verbeteren door het regeneratieve potentieel van stamcellen te vergroten. De Hayflick-limiet wordt bijvoorbeeld bepaald door de telomeerlengte, een zich herhalende sequentie die rijk is aan guanine aan het einde van chromosomen. De telomeren worden korter bij elke ronde van replicatie, wat het vermogen van de cel om te prolifereren beïnvloedt. Telomerase, een ribozym dat de telomeren verlengt, wordt aangetroffen in cellijnen die veroudering tegengaan. Daarom kan het reguleren van de expressie van of exogene toevoeging van telomerase het celregeneratiepotentieel effectief verbeteren, wat bevorderlijk is voor de grootschalige, stabiele en snelle proliferatie van dierlijke cellen ([Shay & Wright, 2000](#)).

Een co-cultuur met patronen is een veelbelovende techniek die wordt gebruikt om cel-naar-cel communicatie en weefselmanipulatie te onderzoeken ([Yamazoe, Ichikawa, Hagihara, & Iwasaki, 2016](#)). Om de kwaliteit van gekweekt vlees te verbeteren, moet co-cultuur met andere cellen zoals adipocyten ook worden overwogen, wat de textuur, structuur en smaak van

kunstvlees zou kunnen verbeteren ([Edelman, McFarland, Mironov, & Matheny, 2005](#) ; [Hocquette et al. . ., 2010](#)). Vanwege het verschil in groeisnelheid brengt co-kweken echter het risico met zich mee dat een onevenredig aantal verschillende celtypen wordt verkregen. Onderzoekers hebben geprobeerd om de richting en knooppunten van de proliferatie en differentiatie van stamcellen nauwkeurig te controleren om op maat gemaakte productie van kunstvlees met een variërend vetgehalte te bereiken. Zo is bij rundvee bekend dat vitamine A-tekort gepaard gaat met een verhoogd intramusculair vetgehalte ([Kruk et al., 2018](#)).

3.3 . Serumvrije kweekmedia

Op serum gebaseerde media zijn op grote schaal gebruikt om dierlijke cellen *in vitro* te laten groeien , wat zorgt voor een hoge groeibevorderende activiteit voor een reeks zoogdiercellijnen (M. [Takahashi, Makino, Kikkawa, & Osumi, 2014](#)). Het serum bevat hechtingsfactoren, micronutriënten, sporenelementen, groeifactoren, hormonen en beschermende elementen die een snelle celgroei bevorderen, maar ook het risico op besmetting met virussen of prionen met zich meebrengen ([Park et al., 2013](#)). Het is van cruciaal belang om een goedkoop en veilig medium te gebruiken voor weefselmanipulatie en het opschalen van gekweekt vlees ([Bjare, 1992](#) ; [Leong et al., 2017](#) ; [Warner, 2019](#)).

Gedurende de laatste decennia zijn er een aantal serumvrije mediumformuleringen gerapporteerd voor cellijnen van zoogdieren en insecten, evenals voor primaire culturen ([Bjare, 1992](#) ; [Brunner et al., 2010](#) ; [Tan et al., 2015](#)). Een serumvrij medium bestaat meestal uit basaal medium en mediumsupplementen. Het basale medium bestaat in het algemeen uit aminozuren, vitamines, glucose en anorganische zouten, die essentiële factoren zijn bij celgroei en metabolisme. Chemische componenten of groeifactoren kunnen als supplementen aan het serumvrije medium worden toegevoegd ([Brunner et al., 2010](#)). Over het algemeen kunnen aanvullende factoren worden onderverdeeld in noodzakelijke en bijzondere factoren. Er zijn noodzakelijke factoren nodig om alle cellijnen in serumvrij medium te laten groeien, inclusief transferrine, insuline, enz. Speciale factoren zijn onder meer hechtende factoren, bindende eiwitten en hormonen. De omschakeling naar serumvrije media vereist echter nog steeds een tijdrovend literatuuronderzoek en een zoektocht van de fabrikant naar geschikte mediumformuleringen. Vergeleken met op serum gebaseerde media, vertonen huidige serumvrije media slechtere prestaties bij groeibevordering ([Miki & Takagi, 2015](#)). Hoewel het een uitdaging is om alle functionele componenten in sera te identificeren en te vervangen ([Brunner et al., 2010](#)), zijn computerondersteund ontwerp en synthetische biologie aangenomen als efficiënte benaderingen voor het bouwen van chemisch gedefinieerde media ([Tan et al., 2015](#)). Brunner et al. ontwikkelde een interactieve online database met serumvrije media en specificeerde de cellijnen die waren aangepast aan serumvrije media, waarin zoektermen zoals soort,

orgaan, weefsel en celtype kunnen worden gebruikt ([Brunner et al., 2010](#)). Er zijn geleidelijke verbeteringen geweest met de toevoeging van belangrijke ingrediënten en het aanpassen van cellen aan serumvrije media door een systematische benadering te gebruiken om het serum geleidelijk te vervangen door essentiële voedingsstoffen of groeifactoren te vervangen ([Aswad, Jalabert, & Rome, 2016](#)), die kunnen grootschalige productie van kweekvlees onder veilige omstandigheden mogelijk te maken.

3.4 . Bioreactoren

Een van de redenen dat grootschalige productie nog moet worden gezien, zijn de moeilijkheden die gepaard gaan met reactoren en het opschalen van kweekvlees ([Verbruggen, Luining, van Essen, & Post, 2018](#)). In de biotech-industrie wordt algemeen erkend dat er een omgekeerd verband bestaat tussen de marktomvang van een product en de verkoopprijs ervan. Tegenwoordig bevinden de meeste producten die zijn afgeleid van celculturen van zoogdieren zich in het gebied met een hoge waarde en een laag volume, bijvoorbeeld therapeutische en farmaceutische producten, terwijl producten aan de andere kant van het spectrum, namelijk levensmiddelenadditieven en diervoeder, worden geproduceerd door microbiële fermentatie ([Oosterhuis, 2018](#)). In de handel verkrijgbare bioreactoren op productieschaal voor celculturen zijn doorgaans 1-2 m³ in werkvolume, hoewel grotere schepen tot 10-20 m³ op maat kunnen worden gebouwd ([Flickinger, Hu, Zhou, Zhou, & Zhong, 2010](#)). Toch zijn deze veel kleiner dan microbiële reactoren, die 200-2000 m³ . kunnen zijn. Er zijn veel redenen waarom kleinere reactoren de voorkeur zouden kunnen hebben voor celkweek. Meerdere kleinere units bieden bijvoorbeeld meer flexibiliteit om de doorvoer en het productportfolio van een fabriek aan te passen aan marktschommelingen; ze bieden ook een eenvoudigere schadecontrole in geval van vervuiling. Misschien wel de belangrijkste factor is dat de vaste kapitaaluitgaven in verband met die reactoren slechts een klein deel van de totale productiekosten uitmaken. Bijgevolg heeft de grootte van de afzonderlijke reactoren geen significante invloed op de winstgevendheid van de producent. Helaas suggereert de conventionele wijsheid dat de reactor en het proces twee ordes van grootte moeten worden opgeschaald om kweekvlees als bulkproduct effectief te laten concurreren met zijn agrarische tegenhangers. in dat geval moeten serieuze technische uitdagingen worden aangepakt. Het is relevant om deze uitdagingen te onderzoeken in de context van het type reactoren dat kan worden gebruikt voor grootschalige productie van kweekvlees, aangezien sommige van de uitdagingen reactorspecifiek zijn.

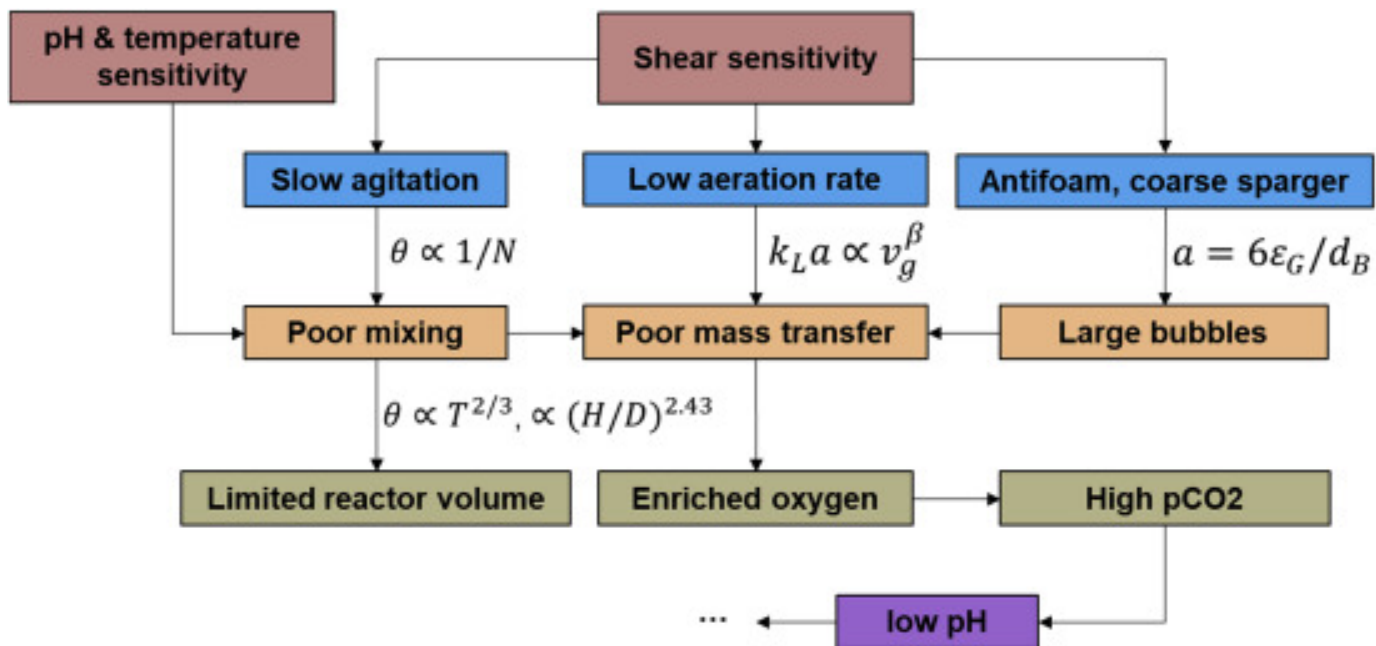
3.5 . Steigers met directe perfusie

De populariteit van perfusioreactoren met 3D-steigers in tissue engineering heeft verschillende onderzoekers ervan overtuigd dat dit de beste techniek is voor de productie van kweekvlees ([Datar & Betti, 2010](#) ; [Specht, Welch, Rees Clayton,](#)

[& Lagally, 2018](#)). Inderdaad, als de uiteindelijke vorm van gekweekt vlees een zeer gestructureerd product is dat grote stukken vlees nabootst in plaats van gemalen vlees - misschien zelfs aangevuld met samengekweekte rode bloedcellen of zelfs bloedvaten - lijkt 3D-steiger inderdaad een redelijke keuze. Vanwege de microporeuze structuur van het steigermateriaal kan de mediastroom echter alleen laminair zijn, waardoor de efficiëntie van de warmte- en massaoverdracht wordt beperkt. Als de optimale aanvullingssnelheid over schalen moet worden gehandhaafd, moet de perfusiestroomsnelheid lineair toenemen met de schaal van de constructie, wat leidt tot hoge schuifspanning en een aanzienlijke drukval. Typische strategieën om dergelijke problemen op te lossen, zijn onder meer het vergroten van de poriegrootte van het steigermateriaal om de permeabiliteit te verbeteren, hoewel dit het eigenlijke doel van de technologie tenietdoet. [Hidalgo-Bastida, Thirunavukkarasu, Griffiths, Cartmell, & Naire, 2012](#)), maar voor het grootste deel is de steiger die bij weefselmanipulatie wordt gebruikt niet meer dan enkele millimeters in de richting van de mediaperfusie en in het centimeterbereik loodrecht op de stroom, met een perfusiesnelheid van ongeveer 1 cm/min of minder ([Gaspar, Gomide, & Monteiro, 2012](#)). Onlangs hebben MacQueen et al. aangetoonde gladde spiercellen van runderen en skeletspiermyoblasten van konijnen gekweekt op verknoopte gelatinevezelsteigers, en die hebben een dikte van 1,5 mm en een oppervlakte van 2 x 3 cm. Het is vermeldenswaard dat de gelatine die in het bovengenoemde onderzoek is gebruikt, afkomstig is van dierlijke producten en eetbaar is, wat voordelig is in vergelijking met andere veelgebruikte materialen zoals polyhydroxyzuren zoals PLA en polymelk - *co* -glycolzuur (PLGA) ([MacQueen et al., 2019](#)). Laminaire stroming met minimale terugmenging betekent ook dat er een steile gradiënt is in opgeloste zuurstof (vooral als het wordt geleverd door externe oxygenatie), CO₂ partiële druk, voedingsstoffen en metabolisch afval van de inlaat naar de uitlaat van de perfusioreactor, vooral onder omstandigheden met een hoge celdichtheid. Als zodanig is homogeniteit vrijwel zeker onhaalbaar. Hoewel sommige eerdere octrooiaanvragen de productie van kweekvlees op commerciële schaal voorzagen op basis van 3D-steigers ([Vein, 2001](#) , [2006](#)), geven recente octrooiaanvragen van serieuzere industriële spelers aan dat de focus nu verschuift naar alternatieve benaderingen ([Gabor, Francoise, & Karoly, 2014](#)). We zijn het erover eens dat vanwege de inherente beperkingen van mengen en massaoverdracht, enz., 3D-steigers in zijn huidige vorm ongeschikt zijn voor grootschalige implementatie. Andere technieken kunnen ontstaan als er voldoende vraag is naar een zeer gestructureerd product, maar er is veel onderzoek en ontwikkeling nodig, en het kan nog een decennium of langer duren voordat het wordt gerealiseerd ([Goodwin & Shoulders, 2013](#)).

3.6 . Suspensiecultuur

Het systeem bij uitstek voor grootschalige ($>1 \text{ m}^3$) zoogdiercelculturen is de alomtegenwoordige geroerde tankreactor, waar de cellen ofwel vrij zijn gesuspenseerd of zijn bevestigd aan gesuspenseerde microdragers. Het laatste geval is van toepassing op kweekvlees, aangezien myoblastcellen ankerafhankelijk zijn ([Verbruggen et al., 2018](#)). Bellenkolommen (inclusief luchtbrugreactoren) vertonen enig potentieel, vanwege hun waargenomen werking met lage afschuiving in afwezigheid van mechanische agitatie ([Merchuk, 1990](#)). Later werd echter erkend dat de lokale dissipatie van wervelenergie die gepaard gaat met het barsten van bellen een belangrijke bron van celbeschadiging is ([Martens et al., 1996](#)), nam de belangstelling voor bellenkolommen voor deze specifieke toepassing af. Een recentere studie wees uit dat een energiedissipatiesnelheid van 400 W/m^3 resulteerde in een 25% reductie in monoklonale antilichaamproductiviteit met een industriële Chinese Hamster Ovary (CHO) cellijn ([Sieck et al., 2013](#)), terwijl een eerdere numerieke studie toonde aan dat het barsten van een bel van 1 mm resulteert in een lokale energiedissipatiesnelheid van 10 MW/m^3 , wat onmiddellijke celdood kan veroorzaken. Inderdaad, de "afschuifgevoeligheid" van zoogdiercellen is de hoofdoorzaak die de schaal en de efficiëntie van de massaoverdracht beperkt, zoals weergegeven in [Fig. 2](#). Slechte massaoverdracht vereist het gebruik van verrijkte lucht als zuurstoftoevoer, wat op zijn beurt resulteert in een hoge CO_2 partiële druk, voor zover het ademhalingsquotiënt (RQ) van dierlijke cellen dicht bij de eenheid ligt. Bijgevolg wordt zuivere N_2 gebruikt om het opgeloste CO_2 te strippen. Hoewel deze complexiteit geen significante bijdrage levert aan de kosten van geneesmiddelen met een hoge toegevoegde waarde, kan deze complexiteit het concurrentievermogen van kweekvlees negatief beïnvloeden. Pluronic F68, een veelgebruikt antischuim- en schuifbeschermingsmiddel, kost in China zelfs meer dan CNY 42 per gram. Bij gebruik in de aanbevolen minimale concentratie van 0,5 g/L (AW [Nienow, 2006](#); [Sieblist, Jenzsch, & Pohlscheidt, 2013](#)), voegt het CNY 21 per liter reactorvolume toe aan de productiekosten. Ter vergelijking: 100 g gehakt wordt verkocht voor CNY 6–9.

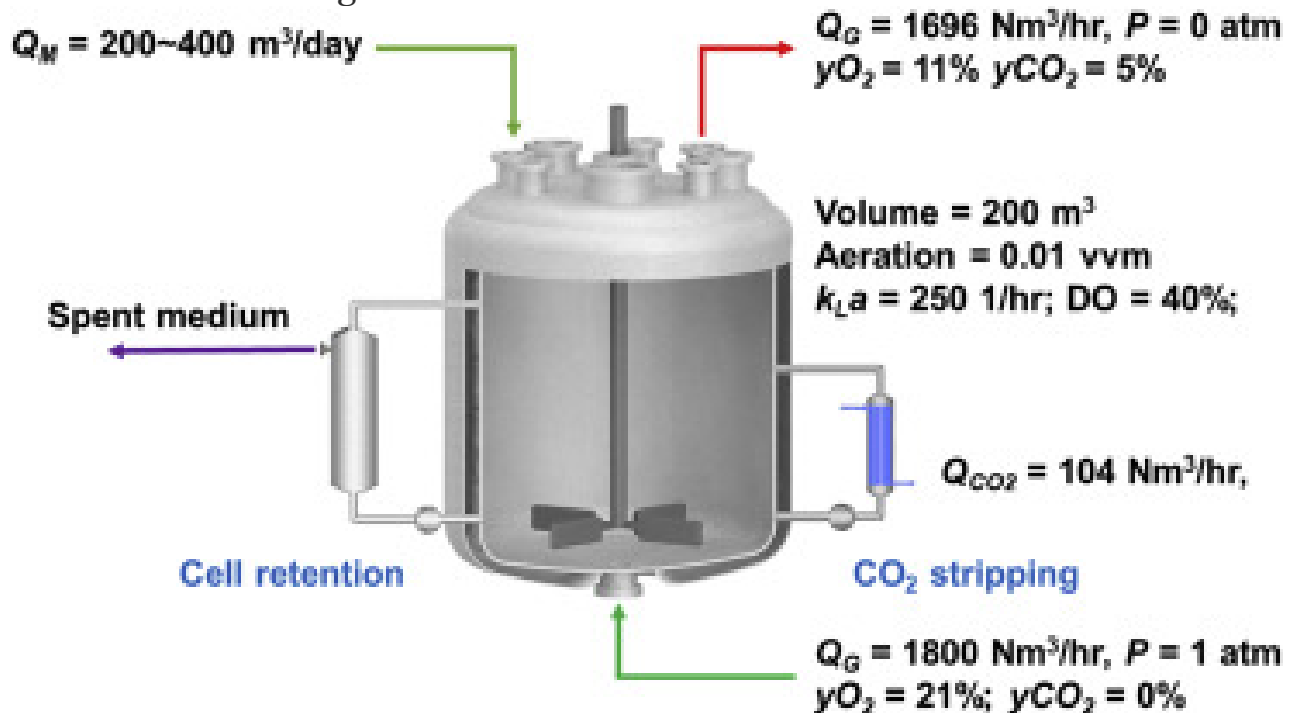


Afb. 2 . **Impact van waargenomen schuifgevoeligheid van dierlijke cellen op het ontwerp en de werking van de reactor.** θ : mengtijd; N :

agitatiesnelheid; t : tankdiameter; H : vloeistofdiepte; k_L : volumetrische massaoverdrachtscoëfficiënt; v_G : oppervlakkige gassnelheid, dwz de volumetrische gasstroomsnelheid gedeeld door het dwarsdoorsnede-oppervlak van de reactor; β : een empirisch instelbare parameter; ϵ : specifiek massaoverdrachtsgebied; ϵ_G : gas holdup, dwz volumetrische gasfractie; D_B : bellendiameter.

Op dit moment is het natuurlijk de vraag hoe een bioreactor op commerciële schaal voor de productie van kweekvles eruit zou zien. Op basis van de typische specifieke zuurstofopname van een dierlijke cel, 10 –16 mol /cel/s en een celdichtheid van 10⁸ cellen/ml, is een volumetrische massaoverdrachtscoëfficiënt van 250 1/h vereist om een opgelost zuurstofniveau van 30-50% terwijl 50% zuurstofconversie wordt bereikt zonder dat er extra druk op de reactor wordt uitgeoefend. Het corresponderende steriele luchtdebiet is ongeveer 1800 Nm³ /h, wat een oppervlakkige gassnelheid oplevert van 0,012 m/s aan de onderkant en het dubbele van die aan de bovenkant van een 10 m hoge reactor met een inwendige diameter van 5 m (Fig. 3). De hydrostatische druk van 1 atm op de bodem van de reactor mag geen schade aan de cellen veroorzaken (Takagi, Ohara, & Yoshida, 1995). Vermeldenswaard is dat bij 50% zuurstofconversie de CO₂-concentratie in de gasfase 10,5% bereikt. Als blijkt dat dit een nadelig effect heeft op de kweek, kan CO₂ direct uit de vloeibare fase worden verwijderd met behulp van een selectief CO₂-permeabel membraan (bijv. Membrana Liqui-Cel® Membrane Contactors). Als alternatief kan de combinatie van een grove beluchter en een hogere beluchtingssnelheid dezelfde zuurstofoverdrachtssnelheid opleveren, ten koste van een lagere zuurstofomzetting, maar met het extra voordeel van een lagere CO₂- partiële druk. Naast snelle zuurstoftoevoer en CO₂ verwijdering, moet het vloeibare medium

worden aangevuld met een verdunningsnelheid van 1-2 l / dag (Y. [Zhang, Stobbe, Silvander, & Chotteau, 2015](#)), terwijl de cellen 100% behouden moeten blijven. Daarom zou een geschikte celretentie-inrichting, bijv. cross-flow filtratie of continue centrifugatie, nodig zijn om de cellen te recyclen terwijl het verbruikte medium wordt afgevoerd of behandeld en hergebruikt.



Afb. 3 . **Processtroomdiagram met belangrijke bedrijfsparameters voor een potentiële grootschalige kweekvleesproductiereactor** . Q_M : medium debiet, Q_G : gasdebiet, P : druk, $k_L a$: volumetrische massaoverdrachtscoëfficiënt, y_{O_2} : O₂ volumefractie, y_{CO_2} : CO₂ volumefractie, Q_{CO_2} : CO₂ stripsnelheid .

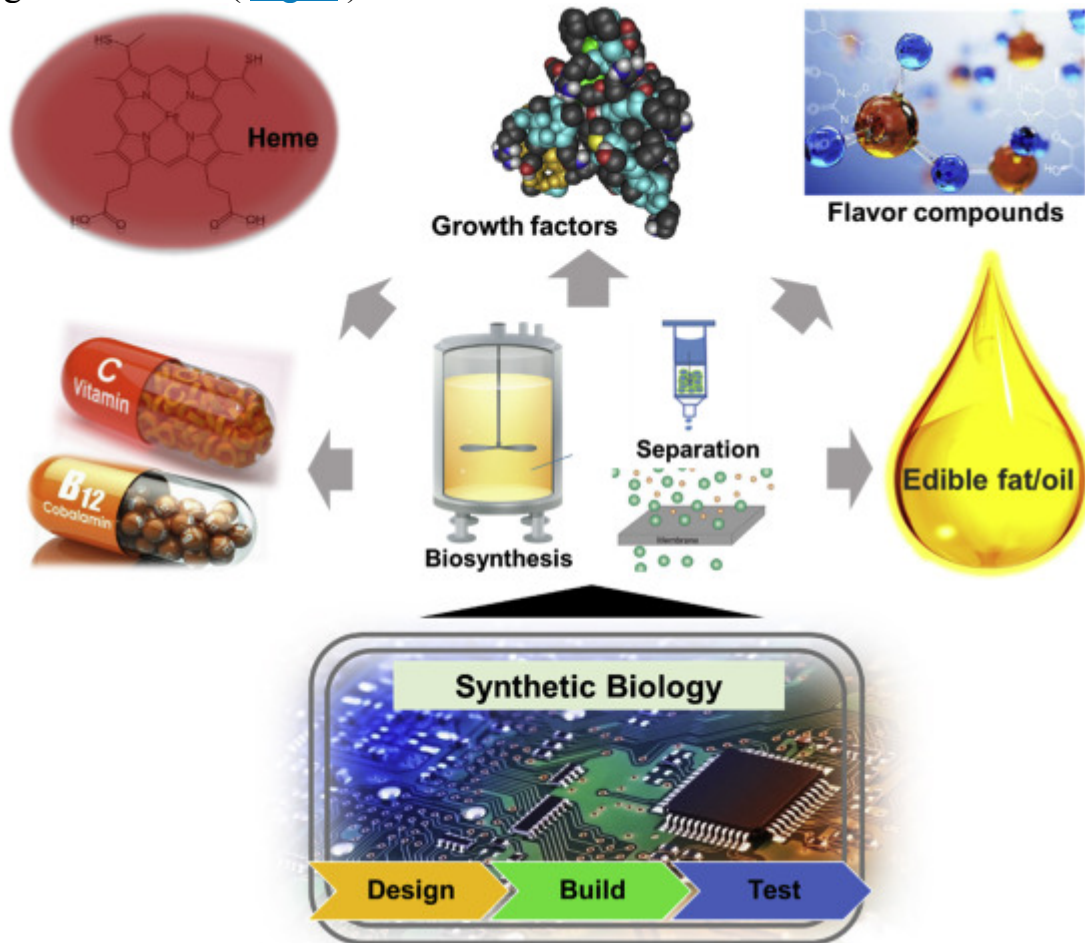
Hoewel de kLa - waarde in het bovenstaande voorbeeld niet bijzonder hoog is, vertegenwoordigt deze nog steeds een toename van meer dan een orde van grootte ten opzichte van die welke typisch worden gezien in reactoren voor dierlijke celkweek. Aangezien kL voornamelijk wordt bepaald door de *fysiochemische eigenschappen van het kweekmedium*, zou de verbetering in kLa voornamelijk komen van het specifieke massaoverdrachtsgebied, a , dat op zijn beurt een functie is van de gasophoping, ϵG (of volumetrische gasfractie) en bellengrootte (DB). Rationele ontwerpen van dergelijke reactoren met behulp van tools zoals CFD zijn tegenwoordig vrij gebruikelijk ([Villiger et al., 2018](#)), en de enige onzekerheid is de afschuifgevoeligheid van de cellen, vooral met betrekking tot het barsten van bellen. Er zijn rapporten over de tolerantie van sommige commerciële cellijnen ([Neunstoecklin et al., 2015](#) ; [Neunstoecklin et al., 2016](#) ; [Sieck et al., 2013](#)), maar er is nog geen kwantitatieve studie uitgevoerd op skeletspiercellen.

3.7 . Microdragers

Zoals hierboven kort vermeld, omdat myoblastcellen ankerafhankelijk zijn, moeten microcarriers worden gebruikt in combinatie met een geroerde tank of bellenkolombioreactor voor gesuspendeerde culturen. Het gebruik van microdragers in de teelt van dierlijke cellen is al lang bekend ([Van Wezel, 1967](#)), en er worden geen grote technische belemmeringen verwacht voor de toepassing ervan in de productie van kweekvlees. De vloeistofsnelheid en/of agitatiesnelheid die vereist is voor de homogenisatie van het kweekmedium moet hoger zijn dan die vereist door microcarriersuspensie op deze schaal, en dit kan worden geëvalueerd met CFD-simulaties ([Delafosse, Loubière, Calvo, Toye, & Olmos, 2018](#)). Er is al wat proof-of-concept experimenteel werk dat het potentiële gebruik van microcarriers voor de productie van gekweekt rundvlees onderzoekt, en wat overblijft is een kwestie van screening op het optimale microcarrier-materiaal en de optimale structuur, hoewel er geen significante verschillen werden waargenomen tussen verschillende in de handel verkrijgbare producten ([Verbruggen et al., 2018](#)), die echter geen van alle eetbaar of biologisch afbreekbaar waren. In het ideale geval, als de microdrager biologisch afbreekbaar en/of eetbaar is, kan deze in het eindproduct worden geïntegreerd, waardoor een stroomafwaartse scheidingsstap wordt geëlimineerd. Materialen die voor dit doel geschikt zijn, zijn onder meer verknoopt pectine, zoals pectine-thiopropionylamide (PTP), en RGD-bevattend polypeptide, zoals gethioleerd cardosine A ([Francoise SM, Brendan PP, Gabor F., & Andras F., 2017](#)). Anders moeten de cellen uit de microdragers worden geogst, maar we verwachten dat dit veel gemakkelijker zal zijn dan in de farmaceutische industrie, omdat als voedselvoorraad de levensvatbaarheid van de losgemaakte cellen van ondergeschikt belang is. Zo kan indien nodig intensief geagiteerd worden ([AW Nienow, Rafiq, Coopman, & Hewitt, 2014](#)). Interessant is dat één conceptueel stroomdiagram ([Van der & Tramper, 2014](#)) lijkt te suggereren dat spiercellen in vrije suspensie kunnen worden gekweekt zonder de noodzaak van microdragers, en bijgevolg kunnen cellen worden geogst door flocculatie en sedimentatie. We weten niet zeker of dit het gevolg was van nalatigheid van de auteurs of dat ze hun argumenten baseren op niet-gepubliceerde gegevens.

3.8 . Veelbelovende voedingsadditieven geproduceerd met synthetische biologie
Met de snelle ontwikkeling van celfabrieken en stamcelculturen kan een kleine hoeveelheid kweekvlees in een laboratorium worden geproduceerd, maar het is tegen hoge kosten en er is nog een lange weg om het te commercialiseren. Bovendien is de marktacceptatie van deze producten ook niet voldoende ([Bekker, Fischer, Tobi, & van Trijp, 2017](#) ; [Verbeke et al., 2015](#)). De belangrijkste reden hiervoor is dat de huidige kunstmatige vleesproducten de kwaliteit van echt vlees niet realistisch simuleren op een kosteneffectieve en hulpbronnefficiënte manier. Daarom is het noodzakelijk om te voldoen aan de voorkeuren voor spierweefsel met echte kleur, voeding,

geur en smaak (Fig. 4).



Afb. 4 . **Op synthetische biologie gebaseerde bio-engineering toegepast op de productie en optimalisatie van kweekvlees** . Microben ontworpen door synthetische biologie zijn gebruikt om individuele moleculen te produceren en kunnen gemakkelijk worden opgeschaald voor commerciële productie, zoals voedseladditieven, enzymen en andere verbindingen. Enerzijds wordt de rode kleur van echt vlees bepaald door het heem in hemoglobine of myoglobine ([Sakata & Honokel, 2001](#) ; [Salvador, Toldra, Pares, Carretero, & Saguer, 2009](#)). Kunstmatige spierweefsels of plantaardige eiwitten missen echter hemoglobine en myoglobine. Om de kleur van echt vlees te simuleren, moet dus stabiele hemoglobine worden toegevoegd aan de producten van kunstvlees ([Jin et al., 2018](#)). Hemoglobine kan worden verkregen uit dierlijk bloed of plantenweefsel, maar deze methode is tijdrovend en arbeidsintensief (X. [Zhang et al., 2017](#)). Daarom is er veel aandacht besteed aan de biosynthese van hemoglobine. Om dit te doen, moeten microbiële cellen eerst voldoende heem ophopen. In natuurlijke organismen zijn er twee routes voor heembiosynthese (de C4- en C5-routes) en de gerelateerde enzymen die betrokken zijn bij deze twee routes en hun coderende genen

zijn duidelijk opgelost ([Layer, Reichelt, Jahn, & Heinz, 2010](#)). Op basis van deze informatie kan een kleine hoeveelheid heem worden gesynthetiseerd met behulp van de C4-route in *Escherichia coli* ([Pranawidjaja, Choi, Lay, & Kim, 2015](#)). Deze strategie vereist echter de toevoeging van glycine en barnsteen zuur als substraten, en dit is ongeschikt voor grootschalige fermentatie. In het laatste onderzoek, zonder toevoeging van substraten, werd extracellulaire heemproductie bereikt in *E. coli* met behulp van de C5-route door remming van heemdegradatie en vorming van bijproducten (XR [Zhao, Choi, & Lee, 2018](#)).

Op basis van voldoende heem in de microbiële cellen kan hemoglobine verder worden gesynthetiseerd uit verschillende bronnen. Momenteel is het meeste onderzoek gericht op het synthetiseren van menselijke hemoglobine omdat het kan worden gebruikt als op hemoglobine gebaseerde zuurstofdragers ([Njoku, St Peter, & Mackenzie, 2015](#)). Hoewel humaan hemoglobine al is gesynthetiseerd in zowel *E. coli* ([Natarajan et al., 2011](#)) als *Saccharomyces cerevisiae* ([Liu, Martinez, Liu, Petranovic, & Nielsen, 2014](#) ; [Martinez, Liu, Petranovic, & Nielsen, 2015](#)), voedsel -graad *S. cerevisiae* is meer geschikt voor de synthese van eukaryote hemoglobines. Het aandeel van heteroloog humaan hemoglobine in intracellulair eiwit kan 7% bereiken in *S. cerevisiae* door de heemsyntheseroute te verbeteren ([Liu et al., 2014](#)) en het zuurstofdetectiesysteem te reguleren ([Martinez et al., 2015](#)). Naast menselijk hemoglobine heeft het Amerikaanse bedrijf Impossible Foods Inc. met succes sojahemoglobine gesynthetiseerd in *Pichia pastoris*. Desalniettemin, aangezien *P. pastoris* geen gastheer is van voedselkwaliteit en de zuiverheid van hemoglobine uit sojabonen die wordt gebruikt bij de productie van hamburgers niet meer dan 65% kan bereiken, zijn er bepaalde voedselveiligheidsrisico's bij het produceren van kunstvlees ([Jin et al., 2018](#)). Bovendien verschilt hemoglobine van soja aanzienlijk van hemoglobine van dieren in structuur en functie. Daarom is het noodzakelijk om stammen van voedingskwaliteit te gebruiken om hemoglobine te produceren uit verschillende dierlijke bronnen (varkens, runderen, schapen, enz.) met behulp van strategieën voor metabolische engineering.

Aan de andere kant is de geur van vlees aangenaam en bevordert het de opname van voedingsstoffen. Om een hogere marktacceptatie te krijgen, moet kunstvlees een echte en aantrekkelijke geur hebben. Door de chemische samenstelling van rauw en gekookt vlees te vergelijken, bleek dat de belangrijkste aromatische stoffen in vlees verschillende zwavel- en stikstofhoudende verbindingen zijn die bij hoge temperaturen uit aminozuren en suikers worden gevormd, met sporen van aldehyden, ketonen, alcoholen, en furanen ([Kang, Alim, & Song, 2019](#) ; [Yu et al., 2016](#)). Zo zijn de afgelopen jaren verschillende aromatische stoffen

geproduceerd door enzymatisch hydrolysaat in dierlijke of plantaardige eiwitten te laten reageren met aminozuren en reducerende sachariden ([Lotfy, Fadel, El-Ghorab, & Shaheen, 2015](#) ; [Wang & Cha, 2018](#)). Rundvleesachtige aromatische stoffen, waaronder thiol, pyrazinen, thiazolen en disulfiden, kunnen worden bereid met conventionele of microgolfverwarming van het enzymatische hydrolysaat van paddenstoeleneiwit met andere voorlopers ([Lotfy et al., 2015](#)). Bovendien kunnen maar liefst 57 vluchtige smaakstoffen die bijdragen aan de vleesgeur worden gevormd door de enzymatische hydrolysaten van sojasausresidu te mengen met ontvette soja ([Wang & Cha, 2018](#)). Bovendien werd analyse van responsoppervlakmethodologie gebruikt om de omstandigheden van de Maillard-reactie te optimaliseren om aromatische stoffen uit veel verschillende bronnen te vormen ([Yang, Song, Chen, & Zou, 2011](#)).

Naast aromatische stoffen is er ook een passende hoeveelheid vetzuren nodig om kunstvlees de unieke smaak van vlees te geven. Door efficiënte, geïntegreerde expressiecassettes toe te passen die twee desaturasegenen van *Mortierella alpina* bevatten, werden grote hoeveelheden linoleenzuur gesynthetiseerd uit intracellulaire voorlopers in *Yarrowia lipolytica* (linolzuur en oliezuur) ([Chuang et al., 2010](#)). Verder kunnen eicosadienzuur, eicosatrienzuur en eicosapentaenzuur worden gesynthetiseerd uit goedkope grondstoffen in *Y. lipolytica* na optimalisatie van de kweekomstandigheden ([Pol et al., 2014](#)). Op dit moment kan de opbrengst aan onverzadigde vetzuren in commerciële ester-producerende stammen meer dan 50% van de totale intracellulaire vetzuren bereiken ([Lazar, Liu, & Stephanopoulos, 2018](#)). Bovendien kunnen linoleenzuur en hun afgeleide esters efficiënt uit cellen worden geëxtraheerd ([Yook, Kim, Woo, Um, & Lee, 2019](#)) en worden gebruikt als voedseladditieven om de smaak van kunstvlees te verbeteren.

3.9 . Productie op maat van kunstvlees met 3D-printing

Door de verbetering van de openbare levensstandaard is er de laatste jaren een groeiende vraag naar vleesproducten die zijn afgestemd op de verschillende voedingsgewoonten. Omdat er significante verschillen in smaak en aroma zijn in het vlees van verschillende delen van dieren, moet eerst het aandeel van de hoofdcomponenten in de gewenste producten worden bepaald. De fysieke samenstelling en het nutriëntengehalte van verschillende stukken rundvlees kunnen worden verkregen door toepassing van nabij-infraroodspectroscopie en massaspectrometrie ([Schonfeldt, Naude, & Boshoff, 2010](#)). Bovendien kunnen verbeterde apparatuur en kunstmatige intelligentie worden gebruikt voor een snelle en nauwkeurige analyse van de componenten van verschillende soorten vlees, waardoor de basis wordt gelegd voor de productie van op maat gemaakt kunstvlees voor snelle consumptie ([Perez et al., 2018](#)). Op basis van deze

resultaten werd het aandeel van de hoofdcomponenten geoptimaliseerd met een multidimensionaal kunstmatig neurale netwerk om een kwalitatief model voor speciaal kunstvlees te construeren ([Zou et al., 2018](#)).

Daarnaast is de vorm van kunstvlees een belangrijke en invloedrijke factor voor de acceptatie door de consument. Op dit moment zijn de producten van kunstvlees te los om het gevoel van echt kauwen te genereren. Daarom is driedimensionaal printen dringend nodig om de structuur van kunstvlees een nieuwe vorm te geven, voor een levendige replicatie van de compacte en elastische structuur van echt vlees ([Godoi, Prakash, & Bhandari, 2016](#)). Gebruik van modelleringssoftware ([Rimann, Bono, Annaheim, Bleisch, & Graf-Hausner, 2016](#)) en spuitapparatuur ([Gunther, Heymel, Gunther, & Ederer, 2014](#)), de driedimensionale structuur van kunstvlees kan worden ontworpen en de grondstoffen en hulpmaterialen kunnen grondig worden gemengd en georganiseerd. Bovendien maakt de nieuwste driedimensionale printtechnologie de fabricage mogelijk van flexibele kunstmatige vaten ([Attalla, Puersten, Jain, & Selvaganapathy, 2018](#)) en lokale controle van de korreligheid en taaheid van kunstvlees ([Lueders, Jastram, Hetzer, & Schwandt, 2014](#) ; [Saratti, Rocca, & Krejci, 2019](#)), om de driedimensionale structuur van echt vlees beter te simuleren.

4 . Vooruitzichten en conclusies

De groeiende wereldwijde vraag naar vlees is een aanzienlijke uitdaging, vanwege de steeds ernstiger wordende hulpbronnen en milieubeperkingen. Hoewel kweekvlees wordt beschouwd als een veelbelovend alternatief voor conventioneel vlees, bevindt het zich nog in de beginfase en ontbreekt het aan een solide basis: kunstvlees mist de noodzakelijke voedingsstoffen, het is duur en voedselveiligheids certificering heeft het nog niet omarmd. Bovendien zijn er fundamentele problemen die moeten worden opgelost met betrekking tot sociale en ethische beperkingen, efficiënte weefselmanipulatie, nauwkeurig afgestemde kweekomstandigheden, grootschalige bioreactoren en de ontwikkeling van kosteneffectieve en veilige serumvrije kweekmedia ([Tuomisto , 2019](#)).

Een ander belangrijk punt betreft de acceptatie van kweekvlees door het publiek. Sommige rapporten tonen aan dat, hoewel mensen de noodzaak begrijpen om duurzame vleesalternatieven te ontwikkelen, ze pessimistisch blijven over de uitdagingen van opgeschaalde productie, kosten en voedselveiligheid, die nog veel veiligheidsonderzoek en promotie moeten ontwikkelen voor een gezond concept van gekweekte vlees ([Tiberius et al., 2019](#)). Op basis van bestaand onderzoek zijn er enkele belangrijke risicofactoren voor kweekvlees, zoals voedselveiligheids certificering van componenten die worden gebruikt in kweekvlees, genetische manipulatie toegepast in kweekvlees.

In het algemeen kan kweekvlees echter, met de toenemende vraag en de verdere ontwikkeling van biotechnologieën, uiteindelijk concurreren met conventioneel vlees als een slachtvrije en duurzame keuze, met het potentieel om de stress van een toenemende bevolking en de vraag naar vlees te verlichten ([Bhat et al . . , 2015](#)).

Dankbetuigingen

Dit werk werd ondersteund door het National Key Research and Development Program van China ([2018YFC1604102](#) , [2017YFC1600403](#)), het National Science Fund for Excellent Young Scholars ([21822806](#)), de Fundamental Research Funds for the Central Universities ([JUSRP51701A](#)), de National First-class Discipline Programma van Light Industry Technology and Engineering ([LITE2018-08](#)), het Distinguished Professor Project van de provincie Jiangsu en het 111 Project ([111-2-06](#)).