

POLITECNICO DI MILANO

Scuola di Ingegneria Industriale e dell'Informazione

Corso di laurea magistrale in Ingegneria Biomedica



Tesi di Laurea Magistrale

**3D Meat Bioprinting – Progettazione e sviluppo di
uno scaffold per la produzione di carne ingegnerizzata.**

Autore : **Michael Romeo**

ID Studente: **971132**

Relatore: **Sara Mantero**

Correlatore: **Federica Potere**

Anno accademico 2021/2022

Indice

| | |
|--|----|
| Indice | 2 |
| Abstract | 5 |
| Sommario | 6 |
| Capitolo 1: Introduzione | 7 |
| • 1.1 Consumo di carne e antropologia | 7 |
| • 1.2 Evoluzione del consumo di carne e impatto ambientale | 10 |
| • 1.3 Composizione della carne | 14 |
| ○ 1.3.1 Proteine | 14 |
| ○ 1.3.2 Acidi grassi | 14 |
| ○ 1.3.3 Vitamine e minerali | 17 |
| ○ 1.3.4 Ferro | 17 |
| ○ 1.3.5 Vitamina B12 | 18 |
| Capitolo 2: Stato dell'arte | 19 |
| • 2.1 Struttura della carne sintetica | 19 |
| • 2.2 Struttura muscolare e cellule staminali | 22 |
| ○ 2.2.1 Struttura muscolare | 22 |
| 2.2.1.1 Fibra muscolare..... | 24 |
| 2.2.1.2 Grasso intramuscolare | 24 |
| 2.2.1.3 Collagene | 25 |
| 2.2.1.4 Proteoglicani e glicoproteine | 25 |
| 2.2.1.5 Turnover dell'ECM | 26 |
| • 2.2.2 Miogenesi | 26 |
| • 2.2.3 Cellule satellite e staminali adipose | 27 |
| • 2.3 Il processo produttivo | 29 |
| ○ 2.3.1 Proliferazione | 33 |
| • 2.3.2 Scaffold | 33 |
| • 2.3.3 Biofabbricazione | 39 |
| • 2.3.4 Differenziazione dei tessuti e bioreattori | 39 |

| | |
|---|-----------|
| • 2.3.5 Dal laboratorio alla scala industriale | 40 |
| • 2.4 Esempio di metodo di produzione della carne sintetica | 42 |
| ○ 2.4.1 Estrazione bSCs e bADSCs | 44 |
| • 2.4.2 Fabbricazione di fibre muscolari bovine tramite bath-assisted 3D printing | 46 |
| • 2.4.3 Fabbricazione di fibre cellulari muscolari, adipose e vascolari mediante TIP..... | 48 |
| • 2.4.4 Costruzione della bistecca mediante assemblaggio di fibre muscolari, adipose e vascolari | 49 |
| Capitolo 3: Materiali e metodi..... | 50 |
| • 3.1 Considerazioni iniziali e analisi di fattibilità | 50 |
| • 3.2 Preparazione del gel | 53 |
| • 3.2.1 Materiali | 53 |
| 3.2.1.1 Gelatina di bovino di tipo A/200 bloom | 53 |
| 3.2.1.2 Alginato | 53 |
| 3.2.1.3 Mastice di Chios | 55 |
| • 3.2.2 Scelta del gel e valutazione dei vari parametri | 55 |
| 3.2.2.1 Gel in gelatina | 55 |
| 3.2.2.2 Gel gelatina-alginato-mastice di Chios | 59 |
| 3.2.2.3 Procedura di produzione del gel gelatina-alginato | 59 |
| • 3.3 Scelta delle cellule e semina cellulare | 60 |
| 3.3.1 Fasi per la preparazione della semina cellulare | 61 |
| • 3.4 Sterilizzazione delle polveri | 62 |
| • 3.5 Creazione del G-code | 63 |
| 3.5.1 Il disegno 3D | 64 |
| 3.5.2 Il G-code | 67 |
| 3.5.3 Attivazione dei processori della stampante | 72 |
| • 3.6 Processo di stampa | 73 |
| • 3.6.1 Fasi della stampa | 74 |
| • 3.6.2 Set up di Incredible + | 75 |
| Capitolo 4: Risultati | 77 |

- 4.1 Valutazioni durante la fase pre-stampa 77
- 4.2 Valutazione durante la fase di stampa..... 79
- Capitolo 5: Conclusione e sviluppi futuri 89**
- Bibliografia 91**
- Lista delle figure 98**
- Lista delle tabelle 100**

Abstract

The goal of this thesis project is the production of a gel, which results suitable for the 3D seeding of fibroblasts, the ink, that will be printed using a 3D printer and will act as a scaffold for a subsequent culture in static conditions. So, we want to verify that the gel allows the survival of the culture in such a way as to be able to use adipose stem cells and satellite cells in the future in a dynamic culture perspective inside a bioreactor. The final goal is to lay the foundations to produce a polymeric blend that allows it to be used in the field of food engineering to produce engineered meat to obtain the finished product bypassing the fiber assembly technologies used up to this moment and ensuring the absence of potentially toxic degradation residues if ingested. The requirements of this material are ease of obtaining and reproducibility, compliance with printing requirements and the creation of an environment that favors cell adhesion and proliferation. The gel was obtained by dissolving gelatin in distilled water and then adding the mastic. A gel is created separately by adding the alginate inside a second beaker containing distilled water. The two inks are inserted into two different syringes and joined using a luer lock. The final gel is loaded inside a cartridge for 3D printers and various printing tests are carried out to evaluate the quality of the gel, in particular the residence time at room temperature is evaluated such as to allow the gelatin to reach the gel-point, the printing pressure, the shape of the extruded filament and the height development of the scaffold. Once the gel has been obtained, which during the various tests reflects all the required requirements, we proceed by loading the gel with fibroblasts. At the end of the printing, we'll proceed to cross-link the scaffold through a solution of 0.25 molar CaCl_2 which will externally cross-link our construct. Finally, the survival of the cells inside the gel is assessed by leaving it in the incubator for 7 days and carrying out a cell count on days 1, 2 and 7. Various experiments conducted have led to the conclusion that the 5% gelatin + 5% alginate + 1% Chios mastic gel was found to comply with all the required requirements, maintaining good print quality, a development in height of the structure and a low print pressures.

Keywords: alginate, gelatin, Chios mastic, 3D printing, fibroblast cultures

Sommario

L'obiettivo di questo lavoro di tesi è la produzione di un gel adatto alla semina 3D di fibroblasti, l'inchiostro, il quale sarà stampato tramite stampante 3D e fungerà da scaffold per una conseguente coltura in condizioni statiche. Si vuole quindi verificare che il gel permetta la sopravvivenza della coltura in modo tale da poter utilizzare in futuro cellule staminali adipose e cellule satellite in un'ottica di coltura dinamica all'interno di un bioreattore. L'intenzione finale è quella di porre le basi per la produzione di un blend polimerico che permetta di essere impiegato nell'ambito del food engineering per la produzione di carne ingegnerizzata, al fine di ottenere il prodotto finito bypassando le tecnologie di assemblaggio di fibre utilizzate sino a questo momento e garantendo l'assenza di residui di degradazione potenzialmente tossici se ingeriti. I requisiti di tale materiale sono la facilità di ottenimento e la riproducibilità, il rispetto dei requisiti di stampa e la realizzazione di un ambiente che favorisca l'adesione e la proliferazione cellulare. Il gel è stato ottenuto disciogliendo gelatina in acqua distillata e aggiungendo in seguito il mastice, a parte si crea un gel aggiungendo l'alginato all'interno di un secondo becher contenente acqua distillata. I due inchiostri vengono inseriti all'interno di due siringhe diverse e uniti utilizzando un luer lock. Il gel finale viene caricato all'interno di una cartuccia per stampanti 3D e vengono effettuate varie prove di stampa per valutare la qualità del gel, in particolare si valuta il tempo di permanenza a temperatura ambiente tale da permettere alla gelatina di raggiungere il gel-point, la pressione di stampa, la forma del filamento estruso e lo sviluppo in altezza dello scaffold. Ottenuto il gel che durante le varie prove rispecchia tutti i requisiti richiesti, si procede caricando il gel con fibroblasti e infine al termine della stampa si procede alla reticolazione dello scaffold tramite una soluzione di CaCl_2 0,25 molare il quale andrà a reticolare esternamente il nostro costruito. Viene infine valutata la sopravvivenza delle cellule all'interno del gel lasciandolo in incubatore per 7 giorni ed effettuando una conta cellulare nei giorni 1, 2 e 7. I vari esperimenti condotti hanno portato alla conclusione che il gel 5% gelatina + 5% alginato + 1% mastice di Chios è risultato rispettare tutti i requisiti richiesti, mantenendo una buona qualità di stampa, uno sviluppo in altezza della struttura e una stampa a basse pressioni.

Parole chiave: alginato, gelatina, mastice di Chios, stampa 3D, colture di fibroblasti

Capitolo 1: Introduzione

1.1) Consumo di carne e antropologia

La carne ha svolto un ruolo cruciale nell'evoluzione umana essendo una componente importante per una dieta sana ed equilibrata grazie alla sua ricchezza nutrizionale caratterizzata da un apporto di alcuni macro e micro-nutrienti che la differenziano dagli altri alimenti [1].

Difatti la carne fresca è costituita per il 75% da acqua mentre la parte restante è rappresentata da proteine (circa il 22%), acidi grassi, ferro, vitamina B12 e altre vitamine del complesso B, zinco, selenio e fosforo.

Attraverso vari studi antropologici è stato rilevato che il consumo di carne è stato fondamentale nell'evoluzione della specie umana, in particolare del cervello e dello sviluppo intellettuale [2], portando ad alcuni cambiamenti morfologici cranio-dentali e intestinali dovuti alla necessità di masticare carne e digerirla, e un aumento del fabbisogno energetico che porta ad un elevato quoziente tra le dimensioni del cervello e del corpo [3,4]. È stata anche evidenziata un'importante influenza del consumo di carne nella postura eretta umana, infatti il bipedismo è probabilmente la prima e più importante caratteristica che ha distinto gli esseri umani dai loro antenati in quanto ha permesso una locomozione e un trasporto di carichi più efficienti, che sono importanti vantaggi nella caccia [4,5,6] .

La crescente incidenza di diverse malattie croniche ha motivato un'ampia ricerca sugli alimenti associati all'aumento del rischio di contrarre queste patologie, infatti nonostante la sua ricchezza nutrizionale, dati epidemiologici hanno trovato una diretta associazione tra il consumo di carne e l'aumento del rischio di diverse forme di cancro, malattie cardiovascolari e metaboliche.

In generale è il contenuto di grasso che desta preoccupazione per il consumo dell'alimento, poiché è proprio l'alto contenuto di grassi saturi a determinare l'insorgere delle problematiche in precedenza descritte, in aggiunta la carne che generalmente viene consumata presenta anche tracce di ormoni i quali possono influire per l'insorgenza di forme di cancro. È importante comunque sapere che il contenuto di grasso dipende da vari fattori quali la specie, il sistema di alimentazione, l'età dell'animale e dal taglio utilizzato. Quindi i tagli più magri come il maiale, il

lombo di manzo o il petto di pollo sono i consigliati in una dieta ben bilanciata per mantenere un basso consumo di grasso e contemporaneamente usufruire della ricchezza nutrizionale dell'alimento[4].

La tabella 1.1 riassume i principali vantaggi di una dieta a base di carne rispetto a quella vegetariana.

| Vantaggi di una dieta vegetariana | Vantaggi di una dieta con consumo di carne |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> ✓ Alto contenuto di fibre ✓ Basso contenuto energetico (Può essere anche uno svantaggio) ✓ Assunzione di antiossidanti ✓ Elevato contenuto di acqua ✓ Bassa presenza di grassi saturi | <ul style="list-style-type: none"> ✓ Alimentazione ricca di energia e nutrienti ✓ Notevole presenza di proteine ad alto valore biologico ✓ Ottima fonte di ferro, zinco e complesso di vitamina B soprattutto B12 |
| Svantaggi di una dieta vegetariana | Svantaggi di una dieta con consumo di carne |
| <ul style="list-style-type: none"> ☒ Scarsa biodisponibilità di ferro ☒ Rischio di deficienza di zinco e vitamina B12 ☒ Mancanza di acidi grassi essenziali polinsaturi come EPA (acido eicosapentaenoico) e DHA (acido docosaesaenoico) ☒ Bassa presenza di proteine ad alto valore biologico | <ul style="list-style-type: none"> ☒ Alcuni tagli presentano una cospicua % di grasso ☒ Contenuto di sodio (nella carne processata) ☒ Elevata presenza di contaminanti come ormoni |

Tabella 1.1 Confronto tra una dieta in cui viene consumata principalmente carne e una basata sul consumo di vegetali.

La rimozione di questo componente dalla dieta potrebbe aumentare il rischio di gravi carenze nutrizionali e compromettere la salute umana, oltre alla carenza di vari micronutrienti, tra cui vitamina B12, composti ricchi di ferro e taurina si andrebbe a incidere su alcuni processi chimici presenti nel nostro cervello.

E' infatti fondamentale introdurre brevemente la chimica su cui si basa il funzionamento del nostro cervello, la quale è determinata in primo luogo da un flusso di informazioni ionico ed elettrico costante necessario per la sua sopravvivenza, inoltre questa sofisticata rete di comunicazione è condotta da sistemi di trasferimento transmembrana composti principalmente da lipidi (60%). I lipidi cerebrali sono composti da fosfogliceridi e colesterolo, questi sono particolarmente ricchi di acidi grassi a catena lunga, principalmente arachidonico (20:4n:6) e docosaesaenoico (22:6n:3), entrambi provenienti da tessuti animali [7].

La taurina è un amminoacido essenziale che nell'organismo umano viene prodotta dal catabolismo ossidativo della cisteina ovvero un amminoacido non essenziale che presenta sul gruppo laterale un gruppo tiolo (S-H) oppure per ossidazione dell'ipotaurina (la figura 1.1 mostra la struttura della taurina e della cisteina) . La taurina si trova in grandi quantità nel cervello, nella retina, nel cuore e nelle piastrine. Sotto forma di acido taurocolico e di acido taurodesossicolico entra nella costituzione degli acidi biliari; nel sistema nervoso centrale è un neurotrasmettitore con azione inibitrice.

Gli esseri umani hanno ereditato una debole capacità di produrre taurina dai suoi precursori metionina e cisteina probabilmente a causa dei bassi livelli di decarbossilasi dell'acido cisteina sulfonico [8], quindi deve essere fornita attraverso la dieta. La taurina si trova principalmente nei crostacei come capesante, cozze e vongole così come nella carne scura di pollo e tacchino.

Nonostante la taurina non sia incorporata nelle proteine, questo aminoacido ha mostrato diverse importanti funzioni biologiche come agire come un agente antiossidante e antinfiammatorio che può essere correlato alla prevenzione delle malattie cardiovascolari e si trova quasi esclusivamente nei prodotti animali.

Altri composti importanti richiesti dall'uomo, come i composti dell'eme o altri composti ricchi di ferro porfirinico sono presenti solo nella carne e sono preferibilmente assorbiti dalla carne invece delle loro forme di ferro ionico [9]. Gli erbivori non possono assorbire questi complessi eme e dipendono solo dalle forme ioniche per l'assorbimento.

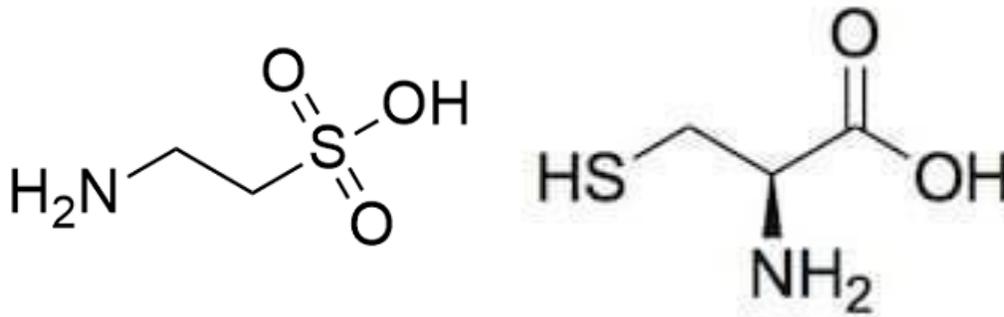


Figura 1.1 A sinistra la struttura della taurina, a destra quella della cisteina

1.2) Evoluzione del consumo di carne e impatto ambientale

L'attuale popolazione mondiale è di circa 8 miliardi, un numero destinato a crescere rapidamente entro il 2050, quando si stima che il numero di persone sulla Terra raggiungerà i 9-11 miliardi.

Un aumento così significativo della popolazione porterà a una crescita esponenziale della domanda di prodotti alimentari e in particolare di origine animale come carne e latticini.

Il consumo di prodotti di origine animale fornisce circa un terzo delle proteine consumate dalla popolazione mondiale, secondo le statistiche della FAO, nel 2014 sono state consumate nel mondo 312 milioni tonnellate di carne, che corrispondono a una media di quasi 43 kg annui per abitante, ed è stato stimato che la domanda globale di carne dovrebbe raggiungere i 455 milioni di tonnellate entro il 2050, con un aumento del 76% rispetto al 2005. Questa tendenza si applica anche all'allevamento ittico, dove la quantità di pesce ottenuto dall'acquacoltura è aumentata da 4,7 a 66,6 milioni di tonnellate in soli 32 anni e si prevede che la domanda globale raggiungerà i 140 milioni entro il 2054. Tuttavia, il consumo medio di carne nel mondo è molto eterogeneo,

come mostrato in Figura 1.2 i paesi sviluppati consumano circa 76 kg pro-capite annui e la media dei Paesi in via di sviluppo è di 34 kg. Mentre i cittadini degli Stati Uniti d’America consumano in media 120 kg l’anno, il consumo pro-capite di oltre 20 Paesi del mondo è inferiore ai 10 kg. Alcune di queste differenze sono dovute a fattori culturali e religiosi che limitano la diffusione del consumo di carne in generale (come in India) o il consumo di carni specifiche (la carne bovina in India e la carne suina nei Paesi musulmani). Tuttavia, uno dei fattori che maggiormente influisce sul consumo di carne è la ricchezza economica di una Paese: i modelli di consumo attuale, infatti, mostrano come i consumatori con i livelli più elevati di benessere (e, quindi, con una maggiore disponibilità economica) richiedono sempre più cibi di origine animale. All’inizio del XXI secolo, il totale della popolazione residente nei paesi ricchi rappresentava il 20% della popolazione totale, ma ha prodotto e consumato il 60% della carne avicola e il 40% delle carni rosse (19).

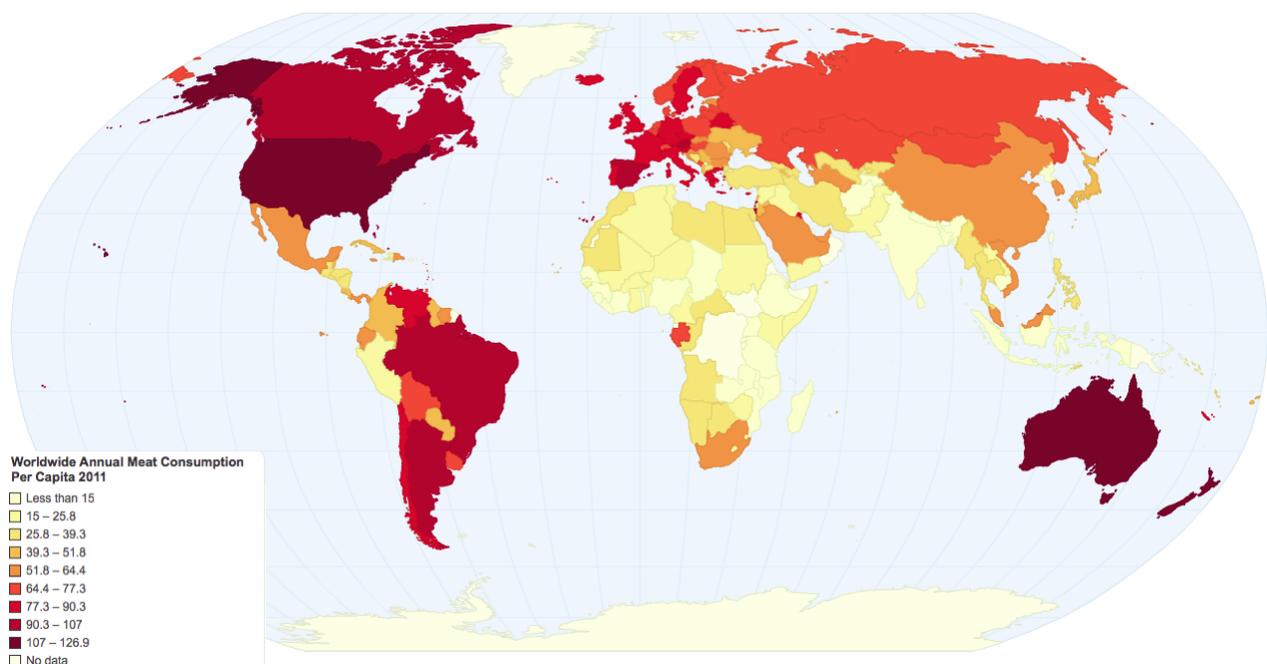


Figura 1.2 Consumo (in KG) di carne pro-capite annuo nel mondo, anno 2011

La globalizzazione e la crescita economica di alcune importanti economie (Brasile, Cina, ecc.) verificatasi negli ultimi decenni hanno determinato notevoli cambiamenti anche nei consumi alimentari di questi Paesi [10]. In Cina, ad esempio, si è verificato e sta proseguendo una

graduale sostituzione degli alimenti caratterizzanti la dieta base (come riso, soia e verdure) con cibi trasformati e contenenti prodotti carnei e lattiero-caseari. Dal 1985 ad oggi, il consumo di carne in Cina è cresciuto del 150% [11]. La Figura 1.3 mostra la produzione in tonellate di carne da parte di ogni singolo paese del mondo durante il 2011, si può notare confrontandola con la Figura 1.1 che non tutti i paesi che consumano più carne sono a loro volta i maggiori produttori, infatti paesi come Cina, Brasile e Argentina nonostante l'aumento negli ultimi decenni del consumo di proteine animali risultano comunque avere un consumo moderato rispetto ad esempio a Stati Uniti e Australia, questo viene spiegato dal fatto che parte della loro economia consista nel produrre un maggior numero di carne per poter essere esportata all'estero.

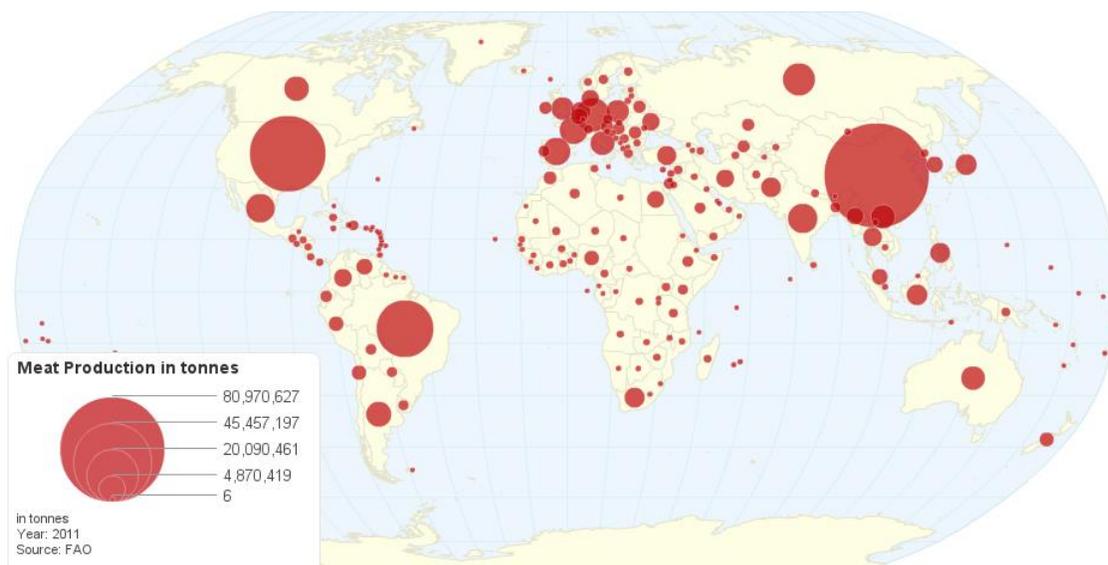


Figura 1.3 Produzione (in KG) di carne per nazione durante l'anno 2011.

L'allevamento intensivo per la produzione di carne determina purtroppo un importante impatto ambientale, tra le varie problematiche riscontriamo:

- La produzione di gas serra, che rappresentano quasi il 15% del totale delle emissioni [12] poiché per produrre un solo Kg di carne di manzo vengono prodotti 59,6 Kg di CO₂.
- Sebbene il bestiame consumi cibo non destinato all'uomo occupa circa il 70% della superficie agricola mondiale e consuma circa il 35% delle colture agricole, competendo

direttamente con la produzione di colture per il consumo umano e con potenziali usi alternativi del suolo, compresa la conservazione della natura [15,16].

- L'intensivo sfruttamento del suolo destinato al pascolo o alla produzione di cereali per bestiame che porta con se gravi conseguenze come l'erosione del suolo, il quale si impoverisce di risorse diventando improduttivo [13].
- La deforestazione, per produrre più carne per soddisfare la richiesta sarà necessario utilizzare più terreni e questo comporta l'abbattimento di estese aree boschive, tra il 1990 e il 2015 la superficie di aree boschive soggette a deforestazione annualmente è stata di circa 50.000 km² [17,18].
- Consumo di acqua, la produzione alimentare globale è il più grande utilizzatore di acqua dolce e utilizza circa il 38% della terra [13].
- I vari prodotti di scarto ottenuti durante i processi produttivi spesso non sono smaltiti correttamente, questo avviene soprattutto in paesi in via di sviluppo, le conseguenze sono negative sulla salute della popolazione poiché si ritrova a vivere in terreni inquinati con conseguente inquinamento delle falde acquifere, spesso questo porta a gravi problemi sanitari della popolazione, nel 2014 la spesa dovuta a danni ambientali e sanitari per anno è stata di 36,6 miliardi di euro. L'allevamento intensivo è stato anche all'origine di numerose crisi di salute pubblica, come il morbo della mucca pazza e, successivamente, la contaminazione di polli d'allevamento, carne di maiale, latte e prodotti a base di salmone con diossina e, più recentemente, influenza suina e influenza aviaria [14,16].

1.3) Composizione della carne

La carne è un'importante fonte di numerosi nutrienti essendo particolarmente ricca di proteine ad alto valore biologico, oltre a micronutrienti come ferro, selenio, zinco e vitamina B12. Anche le frattaglie come il fegato sono fonti cruciali di vitamina A e acido folico.

Il ruolo della carne, specie quella rossa, come fonte proteica è inequivocabile. Tuttavia, il contenuto proteico della carne può variare notevolmente. Secondo i dati della tabella nutrizionale portoghese (INSRJ, 2006) il contenuto proteico medio è del 22%, tuttavia può arrivare fino al 34,5% (petto di pollo) o fino al 12,3% (carne d'anatra) [4].

1.3.1) Proteine

Come negli altri prodotti di origine animale (pesce, latte e uova), le proteine della carne hanno un elevato valore biologico, superiore a quelle delle proteine di origine vegetale,

Difatti questa tipologia di proteina ha punteggi di digeribilità elevati come determinato dai punteggi di amminoacidi corretti per la digeribilità proteica (PDCAAS). I PDCAAS 1.00 più elevati sono stati attribuiti alle proteine dell'albume e della caseina. La carne ha ottenuto un punteggio di 0,92, mentre fagioli borlotti, lenticchie, piselli e ceci che sono ampiamente considerati importanti fonti proteiche nelle diete vegetariane hanno ottenuto valori da 0,57 a 0,71 e il glutine di frumento è stato classificato con un punteggio di 0,25 (FAO/OMS, 1991).

Inoltre, le proteine della carne si sono distinte per il loro contenuto di aminoacidi essenziali ovvero otto dei 20 aminoacidi esistenti non possono essere prodotti dal corpo umano, quindi devono essere forniti dalla dieta. Un consumo inadeguato di aminoacidi, le unità primarie delle proteine, può portare alla malnutrizione proteica [4].

1.3.2) Acidi grassi

Il contenuto di grassi (o lipidi) nella carne può variare molto in funzione dell'età e dell'alimentazione dell'animale: negli ultimi decenni la selezione genetica e la nutrizione animale hanno permesso di ottenere carni più magre. Oltre al grasso invisibile presente nelle membrane cellulari, il grasso della carne si localizza tra le fibre muscolari (intramuscolare o di marezzatura), disposto tra i muscoli (intermuscolare) o a coprire le masse muscolari (sottocutaneo). I

componenti più importanti dei lipidi sono gli acidi grassi, che si suddividono in saturi, monoinsaturi e polinsaturi. Il rapporto tra i diversi acidi grassi varia in funzione di fattori quali la specie e la razza ed è possibile modificarlo attraverso la dieta degli animali, migliorando in particolare il rapporto tra saturi e insaturi. Il grasso della carne apporta anche acidi grassi essenziali (linoleico e α -linolenico). A differenza dei prodotti di origine vegetale, la carne contiene colesterolo, la cui concentrazione è però costante.

Il contenuto di grassi differisce significativamente a seconda del taglio della carne, la tabella 2.1 riassume alcune delle principali differenze che possono essere osservate tra diversi tagli. Il lombo è la parte più magra sia della carne di manzo che di quella di maiale, mentre il petto è generalmente la parte più magra della carne di pollame.

Secondo la tabella della composizione nutrizionale portoghese (INSRJ, 2006), i tagli al dettaglio di manzo variano dal 14% (vitello) al 19% (animale adulto), mentre il maiale può contenere dall'8 al 28% di grasso. Nonostante le differenze che ci si potrebbe aspettare all'interno delle stesse specie di origini diverse, Williams ha riportato risultati simili per il contenuto di grassi nella carne bovina [20]. L'USDA riporta valori dal 5,4 al 7,9% di grassi nei tagli al dettaglio di carne bovina (USDA, 2011). Il grasso di maiale varia dall'8 al 10,7% nelle tabelle USDA, tuttavia questo rapporto considera principalmente i tagli magri (USDA, 2011).

La cottura può avere una grande influenza sul contenuto di grasso della carne e sulla composizione degli acidi grassi. Gerber, Scheeder e Wenk [21] hanno mostrato notevoli perdite di grasso in diversi tagli di carne sottoposti a cottura alla griglia, alla griglia o in padella senza aggiunta di grasso. In particolare per quanto riguarda la composizione degli acidi grassi, è stato osservato un aumento del rapporto polinsaturi/saturi, come riportato anche da Ono et al. [22] probabilmente perché gli acidi grassi polinsaturi fanno parte della membrana cellulare e quindi hanno meno contatto con il calore.

| Taglio di carne (crudo) per 100 g | Valore energetico (Kcal) | Proteine (g) | Grassi (g) |
|--|--------------------------|--------------|------------|
| Petto di pollo senza pelle | 108 | 24,1 | 1,2 |
| Petto di pollo | 176 | 24,1 | 8,9 |
| Pollo (in media) | 110 | 22,9 | 2 |
| Bistecca di manzo | 122 | 20,9 | 4,3 |
| Lombo di manzo | 114 | 21 | 3,3 |
| Lombo di vitello | 148 | 19,9 | 7,6 |
| Lombo di maiale | 131 | 22,2 | 4,7 |
| Costoletta di maiale | 355 | 17,3 | 31,8 |
| Zampa di maiale | 152 | 21 | 7,5 |
| Petto di tacchino senza pelle | 105 | 23,4 | 1,3 |
| Tacchino senza pelle (in media) | 137 | 20,5 | 6,1 |
| Carne di anatra senza pelle (in media) | 133 | 19,3 | 6,2 |
| Montone (braciola o bistecca) | 124 | 19,7 | 5 |

Tabella 1.2 Valori nutrizionali in 100g di prodotto per differenti tagli di carne.

Per diversi decenni, le linee guida dietetiche raccomandano di evitare i grassi saturi per prevenire le malattie cardiovascolari portando ad una significativa diminuzione del consumo di prodotti animali, in particolare di carne. I meccanismi attraverso i quali i grassi saturi esercitano effetti peggiorativi sulla salute metabolica cardiovascolare e generale sono diversi, Kennedy, Martinez, Chuang, Lapoint e Mcintosh [23] hanno proposto che un consumo eccessivo di acidi grassi saturi promuoverebbe l'espansione e ipertrofia del tessuto adiposo le quali come conseguenza porterebbero all'apoptosi. Questi fenomeni promuoverebbero il rilascio di proteine infiammatorie come citochine e chemochine inducendo infiammazione e insulino-resistenza, aumentando così il rischio di malattie cardiovascolari e sindrome metabolica [4]

Considerando l'importante ruolo della carne nella dieta umana e la stimata crescita del consumo nel corso degli anni, e le preoccupazioni relative al suo ruolo nella salute umana, diversi studi si sono concentrati sui modi per migliorare la composizione degli acidi grassi della carne, in particolare la carne bovina.

Diversi studi hanno dimostrato che il profilo degli acidi grassi della carne può essere significativamente influenzato dall'alimentazione. Sono state riscontrate differenze significative

tra la composizione di acidi grassi degli animali da pascolo e quelli nutriti con cereali con concentrazioni più elevate di acidi grassi polinsaturi nei gruppi nutriti da pascolo.

Da uno studio effettuato da Sofia Fredriksson Eriksson e Jana Pickova nel 2007 è emerso che l'erba fresca esercita una maggiore protezione contro i batteri del rumine per gli acidi grassi polinsaturi rispetto ai cereali ed è anche importante considerare la presenza di altri metaboliti secondari che potrebbero inibire la bioidrogenazione microbica ovvero un processo che consiste in una serie di reazioni chimiche ad opera dei batteri che effettuano la fermentazione all'interno del rumine. Si tratta della trasformazione di acidi grassi insaturi cis in quelli saturi, sostituendo il doppio legame carbonio-carbonio con un legame singolo con l'idrogeno.

1.3.3) Vitamine e minerali

La carne risulta essere un'ottima fonte di molteplici vitamine e minerali in particolare la carne rossa fornisce circa il 25% delle assunzioni alimentari raccomandate per riboflavina, niacina, vitamina B6 e acido pantotenico per 100 g e i due terzi del fabbisogno giornaliero (DR, Daily Requirement) di vitamina B12 nella stessa porzione [20].

Nel pollame, il petto di pollo è un'ottima fonte di niacina (100 g fornisce il 56% di DR) e vitamina B6 (27% di DR) mentre 100 g di tacchino forniscono il 31% di niacina DR e 29% di vitamina B6 DR. Entrambi forniscono dal 6 all'8% del DR (USDA, 2011).

La carne è anche una delle migliori fonti di zinco, selenio, fosforo e ferro. Tagli magri di manzo forniscono circa il 37% di selenio DR, il 26% di zinco DR e 20% di potassio DR in una porzione di 100 g (USDA, 2011).

Nonostante ciò, alcuni studi hanno dimostrato che la cottura in generale produce perdite significative di vitamine del gruppo B e di oligoelementi [24].

1.3.4) Ferro

Il ferro ha un ruolo cruciale nella salute umana e la sua carenza porta al compromissione di diverse funzioni biologiche come disturbi nella crescita e nello sviluppo del bambino ed è presente in due diverse forme: ferro emico e ferro non emico.

Il ferro emico proviene da emoglobina e mioglobina quindi è presente solo negli alimenti di origine animale tra cui appunto la carne; È altamente biodisponibile e facilmente assorbito nel lume intestinale perché è assimilato come molecola intatta dagli enterociti [4]

Il ferro non emico è presente principalmente nelle verdure con foglie scure come spinaci e verdure crocifere, nei legumi e nei latticini, è importante notare che le fonti di ferro vegetale sono particolarmente ricche di potenziali inibitori dell'assorbimento del ferro come il fitato e alcuni composti fenolici come flavans polimerizzati [25].

Il manzo ha il più alto contenuto di ferro emico, mentre il ferro e il contenuto di ferro emico sono minori nelle carni bianche come il pollo. Il ferro emico della carne rossa è intorno al 39.20% mentre nella carne bianca può arrivare fino al 26.15%, la carne di maiale ha valori intermedi tra manzo e pollo [26].

La carne e i prodotti a base di carne possono contribuire fino al 18% del fabbisogno giornaliero di ferro il che lo rende importante in una dieta sana e bilanciata e, inoltre, fondamentale nel prevenire una delle carenze nutrizionali più comuni (OMS/ UNICEF/UNU, 2001).

Tuttavia, nonostante il suo ruolo vitale nel corpo umano, un'eccessiva assunzione di ferro può essere pericolosa. Alte dosi di ferro possono causare danni alla mucosa intestinale e portare a tossicità sistemica [27], questo eccesso può anche causare danni in seguito alla formazione di radicali liberi in diversi tessuti circostanti [28].

Per tali ragioni, esiste un livello massimo tollerabile di assunzione per evitare effetti negativi sulla salute è di 45 mg/die per gli adulti.

1.3.5) Vitamina B12

Gli alimenti di origine animale sono considerati le principali fonti alimentari di vitamina B12, quindi una rigida dieta vegetariana è associata a bassi valori di assunzione di vitamina B12, la carenza di questo micronutriente è la causa principale di anemia megaloblastica. E' anche fortemente associato con alti livelli di omocisteina nel sangue che è un fattore di rischio di malattie cardiovascolari, può in aggiunta causare sintomi depressivi e disturbi neurologici [4].

Capitolo 2: Stato dell'arte

2.1) Storia della carne “sintetica”

Nel corso della storia, la società ha dovuto affrontare sfide legate al cibo, per far fronte a valori morali, nuovi stili di vita e altri elementi hanno delineato culture alimentari distinte.

La cultura alimentare è in continua evoluzione grazie all'introduzione di nuovi prodotti alimentari sul mercato, dei cambiamenti nelle abitudini dei consumatori e delle preferenze individuali [31].

Quindi, sebbene le culture del cibo siano mutevoli, continuano a presentare identità e ideologie di popolazioni specifiche nel tempo. Tuttavia, alcuni aspetti che promuovono lo sviluppo di nuovi prodotti alimentari si verificano in momenti diversi della storia della civiltà umana, negli anni '70, la domanda di proteine appetibili come fonte alternativa di proteine animali, basata sia sul desiderio di non consumare carne che su problemi di sicurezza alimentare, ha promosso, ad esempio, la produzione di proteine di soia [31].

Ciononostante, le stime relative alla crescita della popolazione e alla carenza di cibo degli attuali sistemi di produzione (FAO 2011), cambiamenti nel comportamento dei consumatori [32], crescente malcontento alimentare [33] e un previsto aumento del 60% della macellazione nei successivi 30 anni [34] sollecitano la ricerca sulla produzione di carne sintetica (Figura 2.1).

Lo scopo di questa tecnologia è creare un prodotto con la stessa consistenza, aspetto, sapore e valore nutritivo della carne convenzionale [35]. Ciò rappresenterebbe una fonte quasi infinita di proteine con impatti ambientali potenzialmente mitigati [36]

Tuttavia essendo in una fase iniziale, è necessario affrontare le sfide legate alla fattibilità tecnica ed economica della produzione su larga scala [37], ma le stime indicano che i primi prodotti commerciali potrebbero essere disponibili in meno di 10 anni. La produzione di muscoli bioartificiali derivati da cellule satelliti è studiata da circa 15 anni; solo all'inizio del XXI secolo si cominciò a considerare il suo potenziale di produzione alimentare [38].

Nel 2013 l'Università di Maastricht, nei Paesi Bassi, ha utilizzato tecniche e principi di ingegneria del tessuto muscolare e cellule staminali coltivate in vitro prelevate da muscolo scheletrico bovino vivo per formare filamenti commestibili al fine di ricreare in laboratorio il primo hamburger sintetico della storia, con un investimento di 250mila euro. Ipotizzando, tuttavia, che i costi di produzione della carne artificiale possano scendere in futuro in modo tale da produrre il costruito su scala industriale.

Uno studio di McKinsey [39] effettuato nel 2020 colloca nel 2030 il raggiungimento della parità di prezzo tra bistecca "vera" e bistecca "in provetta". Addirittura, l'azienda biotecnologica israeliana Future Meat Technologies, che ha appena raccolto 347 milioni di dollari di finanziamenti e annunciato l'apertura del primo impianto di produzione su larga scala negli Stati Uniti, riuscendo ad abbassare il costo di produzione a 1,70 dollari per 110 grammi di pollo "sintetico", così da centrare l'obiettivo di parità dei prezzi prima di quanto il mercato preveda [36].

Proprio la riduzione dei costi, a detta degli esperti di Barclays research, crea una congiuntura favorevole per l'hamburger ingegnerizzato, spinto anche dalla crescita della popolazione mondiale, da motivazioni ecologiche legate al minore impatto ambientale delle emissioni (sempre che si ricorra a energia elettrica da fonti rinnovabili) e da questioni etiche connesse agli allevamenti di animali. Da qui la stima di Barclays che il giro d'affari della bistecca sintetica possa arrivare a valere sino a 450 miliardi di dollari nel 2040, ossia il 20% del mercato globale della carne.

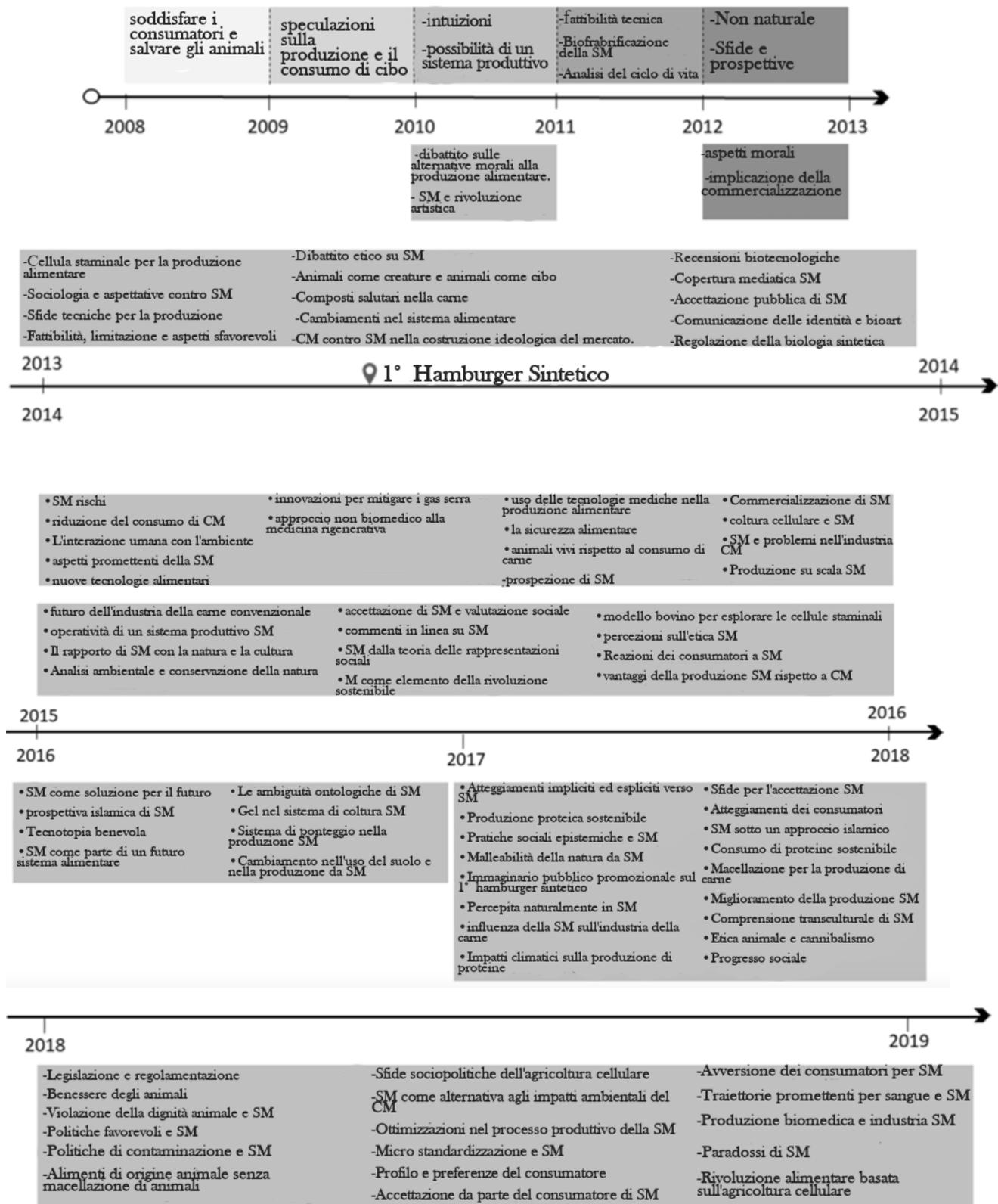


Figura 2.1 Timeline contenente le principali pubblicazioni sulla carne sintetica

2.2) Struttura muscolare e cellule staminali

Tenendo in considerazione che la carne deriva da una parte di muscolo dell'animale, se si vuole riprodurre attraverso approcci ingegneristici l'alimento in questione è necessario mimare a livello cellulare e strutturale al fine di replicare consistenza e proprietà nutrizionali, per fare ciò bisogna considerare alcuni aspetti fondamentali che verranno esplicitati in questa sezione, in particolare verrà introdotta la struttura del tessuto muscolare, il suo processo di formazione all'interno del corpo (miogenesi) ed infine le due principali tipologie di cellule da cui il muscolo deriva ovvero cellule satellite e cellule staminali adipose [40].

2.2.1) Struttura muscolare

Per produrre carne sintetica è particolarmente importante capire come la struttura muscolare sia correlata alle proprietà nutrizionali e organolettiche della carne. La tessitura fibrosa associata alla carne deriva da una complessa struttura tissutale gerarchica. L'unità funzionale principale è la fibra muscolare, chiamata anche miofibra, che è circondata da tessuto connettivo, grasso intramuscolare, vasi sanguigni e nervi. I principali determinanti della struttura e della qualità muscolare sono le fibre muscolari, il grasso e i tessuti connettivi [41]. Le fibre muscolari sono organizzate in fasci chiamati fascicoli. Il tessuto connettivo è separato in endomisio, perimisio ed epimisio, che circondano rispettivamente le fibre muscolari, i fascicoli e interi muscoli (Figura 2.2a e b).

Sebbene il sistema vascolare non contribuisca sostanzialmente alle proprietà organolettiche, il suo ruolo nel facilitare il trasporto di ossigeno, nutrienti e rifiuti dovrà essere tenuto in considerazione durante il processo produttivo [44,45,46]. Similmente la riproduzione dei nervi presenti nei muscoli non è fondamentale da un punto di vista organolettico, ma può contribuire alla maturazione delle fibre muscolari [42,43]

Il valore nutritivo della carne deriva principalmente dal suo ruolo di fonte di proteine di alta qualità contenenti tutti gli aminoacidi essenziali, gli acidi grassi essenziali e una varietà di vitamine e minerali. Pertanto per produrre carne sintetica si dovrebbe ricreare un tessuto

composto dal 90% in volume di fibre muscolari mature circondate da una piccola quantità ($\approx 10\%$) di tessuto adiposo e connettivo in modo da ottenere gli stessi aspetti nutrizionali e strutturali di carne [41]. Le sezioni seguenti discuteranno i componenti del tessuto muscolare che potrebbero essere più importanti da replicare nella carne coltivata ovvero fibre muscolari, grasso ed matrice extracellulare (ECM), nonché le tecniche più comuni per misurare le proprietà meccaniche rilevanti per la qualità della carne.

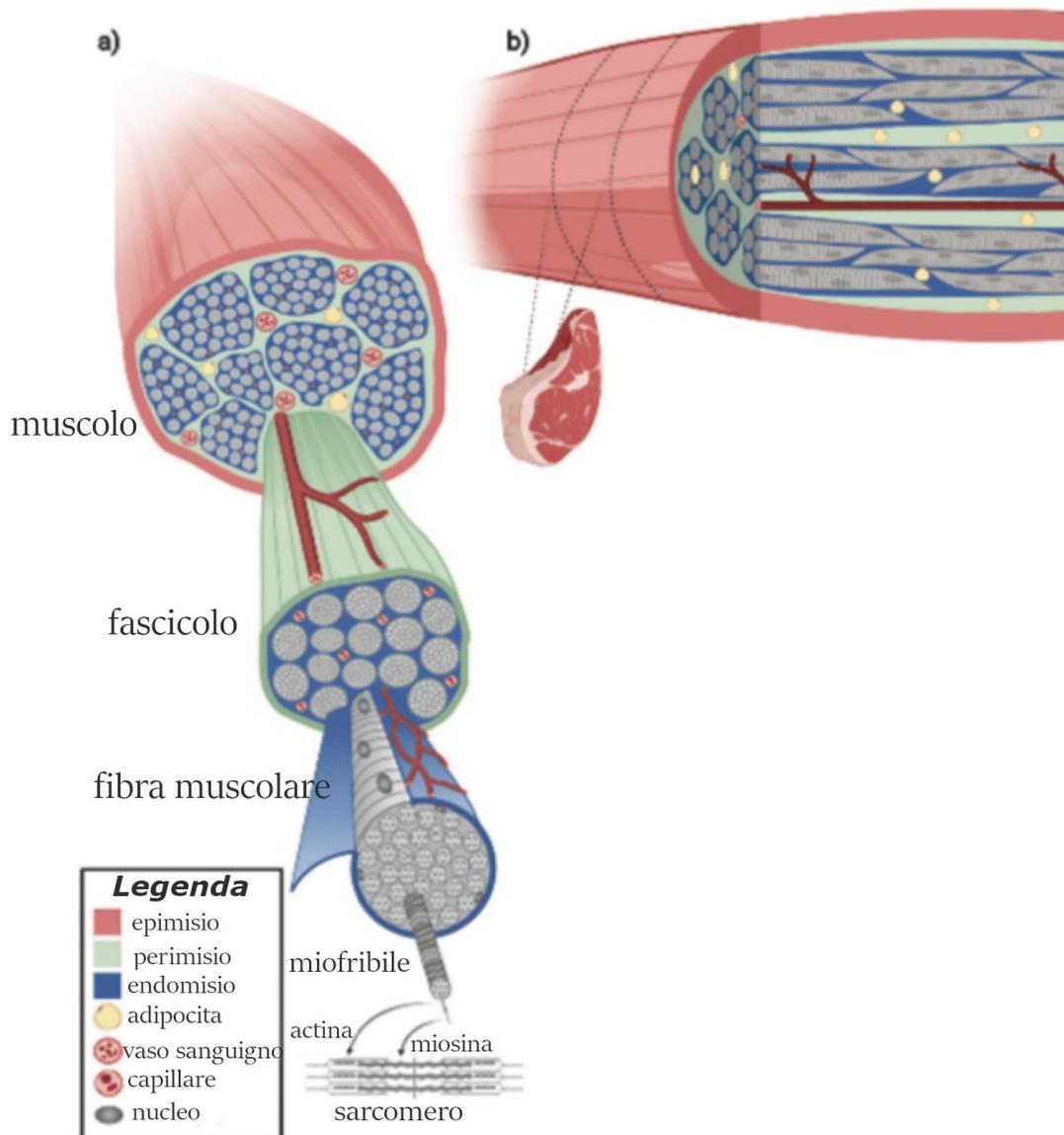


Figura 2.2 Rappresentazione schematica della struttura gerarchica del muscolo vertebrato. a) Vista in sezione trasversale di un muscolo con un singolo fascicolo, fibra muscolare, miofibrilla e

sarcomero. b) Muscolo di mammifero tagliato longitudinalmente e in sezione per evidenziarne l'omologia strutturale. Il singolo muscolo è orientato in modo tale che le fibre muscolari corrono parallele alla pagina. Le linee tratteggiate indicano la relazione tra il muscolo diagrammato e una bistecca b).

2.2.1.1) Fibra muscolare

Una fibra muscolare matura di un animale terrestre ha una lunghezza di 1–40 mm e 10–50/100 µm di diametro [41], sono per lo più multinucleate, con un massimo di 100 nuclei [47]. Queste cellule sono piene di miofibrille simili a cavi di 1-3 µm di diametro, che sono fasci di filamenti contrattili composti da lunghe catene di actina e miosina [40]. Questi filamenti sono divisi in unità funzionali contrattili chiamate sarcomeri. Il pattern di sovrapposizione di actina e miosina all'interno delle miofibrille conferisce alle cellule muscolari il loro caratteristico aspetto striato. Le fibre muscolari rosse in particolare sono più ricche di mioglobina e quindi di ferro eme rispetto a quelle bianche, rendendo il muscolo rosso più nutriente come fonte di ferro biodisponibile [41]. La mioglobina si trova all'interno delle fibre muscolari, principalmente nelle fibre ossidative (a contrazione lenta) piuttosto che nelle fibre glicolitiche (a contrazione rapida).

2.2.1.2) Grasso intramuscolare

I grassi intramuscolari sono un fattore determinante per la succosità, il sapore e la nutrizione della carne e contribuiscono alla tenerezza attraverso vari meccanismi [40,41]. Il grasso intramuscolare è composto in primo luogo da degli adipociti, che si trovano incorporati nel tessuto muscolare tra le fibre muscolari e i fascicoli. Il grasso intramuscolare comprende anche lipidi strutturali, fosfolipidi e goccioline lipidiche intracellulari all'interno delle fibre muscolari. Il grasso è nutrizionalmente importante come fonte di vitamine lipofile A, D, K ed E e di lipidi essenziali come omega-3 polinsaturi acidi grassi [40]. Complessivamente, il contenuto di grassi saturi è tipicamente più alto nei muscoli longissimus di manzo e maiale che nel pesce e nelle carni avicole, che hanno percentuali più elevate di acidi grassi polinsaturi. Il contenuto di grasso intramuscolare varia in base a fattori tra cui specie, tipo di muscolo, razza e apporto nutritivo. Anche la dimensione media degli adipociti animali è eterogenea e dipende dall'accumulo di lipidi intracellulari [40].

2.2.1.3) Collagene

Il collagene è la principale proteina strutturale nella matrice extracellulare muscolare, nei muscoli dei mammiferi sono presenti collagene fibrillari I e III. La membrana basale muscolare è composta principalmente da una rete di collagene IV, ma sono presenti anche i tipi VI, XV e XVIII, dove gli ultimi due sono proteoglicani eparan solfato [48]. La reticolazione del collagene contribuisce sostanzialmente alle proprietà meccaniche del tessuto muscolare e possono variare notevolmente a seconda del tipo di muscolo, della specie e dell'età [41]. I muscoli ricchi di collagene sono leggermente meno nutrienti a causa della maggiore quantità di glicina, un aminoacido non essenziale e della mancanza dell'aminoacido essenziale triptofano [40]. Nella maggior parte degli animali allevati per produrre carne, l'animale viene abbattuto in giovane età quando i livelli di reticolazione del collagene sono ancora piuttosto bassi [40].

2.2.1.4) Proteoglicani e glicoproteine

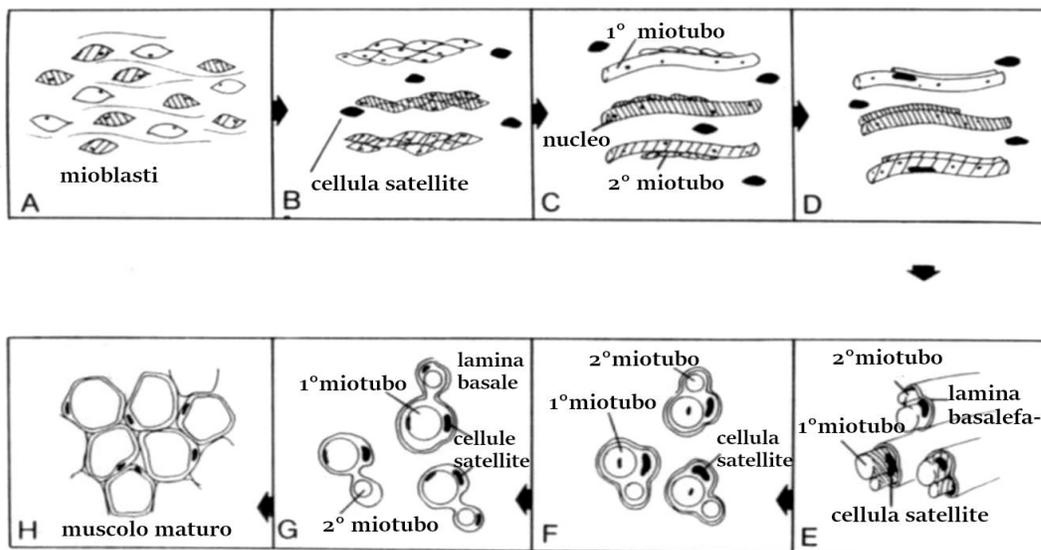
I proteoglicani e le glicoproteine sono importanti componenti strutturali della ECM, entrambe le macromolecole contengono una proteina legata ai carboidrati ma differiscono in base al tipo di carboidrati. I proteoglicani sono composti da un nucleo proteico con catene attaccate di glicosaminoglicani caricati negativamente e altamente idratati come l'eparan solfato e il dermatan solfato [48]. I proteoglicani aiutano a collegare la membrana basale all'endomisio collagene legandosi direttamente al collagene, inoltre hanno la funzione di sequestro dei fattori di crescita. I proteoglicani più abbondanti nel tessuto muscolare sono quelli che si legano ai glicosaminoglicani dermatan solfato e condroitin solfato, inclusi decorina e biglycan. Le glicoproteine contenenti oligosaccaridi come fibronectina, laminina e nidogeno aiutano a collegare la membrana cellulare delle fibre muscolari alla membrana basale, in particolare la fibronectina e la laminina si legano direttamente alle integrine sulla superficie cellulare e al collagene IV nella membrana basale. Le glicoproteine si legano anche tra loro, contribuendo alla complessa struttura della rete ad incastro [40].

2.2.1.5) Turnover dell'ECM

L'ECM viene costantemente sintetizzato, degradato e riorganizzato. La degradazione dell'ECM è necessaria per la formazione dei miotubi e la migrazione cellulare e il turnover è in gran parte regolato da enzimi catabolici chiamati metalloproteinasi della matrice (MMP) e dai loro inibitori (inibitori tissutali delle metalloproteinasi o TIMP). Le gelatinasi (MMP-2 e -9) degradano il collagene IV, la fibronectina, la laminina e i proteoglicani e le collagenasi (MMP-1 e -13) degradano i collagene I e III [48]. All'interno del muscolo, l'ECM viene principalmente secreta e mantenuto dai fibroblasti. È stato dimostrato che le cellule miogeniche secernono collagene, decorina e MMP-2 e le cellule satellite secernono MMP-2, ma i fibroblasti sono necessari per organizzare le molecole ECM nella corretta struttura della matrice. Dato il ruolo critico delle MMP e TIMP nella differenziazione, migrazione e proliferazione cellulare, questi enzimi possono fungere da interessanti bersagli ingegneristici di linee cellulari per ottimizzare i processi di produzione di CM a valle [40].

2.2.2) Miogenesi

Per miogenesi si fa riferimento al processo di formazione delle fibre muscolari.



Fasi dello sviluppo del sistema neuromuscolare [49]:

- A: Formazione dei mioblasti, ^[1]_{SEP} ovvero i precursori delle cellule muscolari.
- B: I mioblasti si fondono l'uno con l'altro formando piccole cellule polinucleate chiamati i miotubuli. Durante l'aggregazione le estremità dei miotubuli crescono fino ad arrivare a 100-300 um di lunghezza. I le prime strutture che andranno a formarsi verranno chiamate miotubuli primari.
- C, D, E, F: Successivamente i miotubuli si separano l'uno dall'altro e si riuniscono in fascicoli, ricoperti da una membrana chiamata lamina basale. Altri mioblasti si fondono tra di loro e si aggregano ai miotubuli primari posizionandosi al di sotto della lamina basale. Queste ultime strutture si chiamano miotubuli secondari, la fusione radiale e longitudinale dei mioblasti al di sotto della lamina basale provoca la formazione delle fibre muscolari. Alcuni mioblasti non utilizzati rimangono come cellule satellite che verranno incorporate nelle cellule mature.
- G: I miotubuli primari prima, e quelli secondari poi, vengono successivamente riempiti di proteine contrattili (actina, miosina) che spingono i nuclei verso l'esterno. A questo punto le fibre muscolari sono mature e pronte per essere innervate..
- H: Il muscolo è completo e cresce; le fibre si dispongono l'una vicina all'altra formando una struttura compatta caratteristica del muscolo adulto.

All'interno di una cultura cellulare, la maggior parte dei mioblasti tende a proliferare se sono presenti fattori di crescita. Quando esso si esaurisce, i mioblasti cessano la divisione e subiscono una differenziazione terminale in miotubi.

2.2.3) Cellule satellite e staminali adipose

Si definisce cellula staminale una cellula che può dividersi in due cellule figlie identiche alla cellula madre o che si può dividere in due cellule figlie di cui una identica alla madre e l'altra impegnata in una specifica linea di differenziazione. Questo tipo di cellule sono caratterizzate dalla presenza di marker di superficie (di solito glicoproteine) specifiche per una certa progenie di cellule staminali e simultaneamente dall'assenza di marker di superficie specifici per altre

progenie [50].

Le cellule staminali si trovano in tutti i tessuti e si collocano all'interno di nicchie, sono responsabili dell'omeostasi dei tessuti e per la riparazione in caso di danno. Questo tipo di cellule inoltre non va incontro a senescenza; quindi, una cellula staminale continuerà a replicarsi per un numero illimitato di volte [50].

Per produrre carne sintetica serviranno due tipi di staminali, quelle del tessuto muscolare chiamate cellule satellite e per il tessuto adiposo chiamate staminali adipose.

Le cellule staminali da tessuto adiposo (ADSC) sono cellule staminali mesenchimali, ossia cellule multipotenti che possono dare origine a molti tipi cellulari differenti; da quelli del tessuto adiposo a quelli della cartilagine, incluse le cellule delle ossa, dei tendini, dei legamenti, dei muscoli, dei vasi sanguigni, del sistema nervoso e altre ancora.

Possono essere isolate dalla frazione stromale vascolare (stromal vascular fraction, SVF) ottenibile dal tessuto adiposo mediante digestione enzimatica, e possono essere coltivate in laboratorio. Ciò rende possibile ottenere numeri significativi di staminali per applicazioni ingegneristiche anche da piccoli prelievi di tessuto adiposo.

Le cellule satelliti si occupano della riparazione delle fibre muscolari in seguito a traumi e lesioni, poiché i nuclei presenti nelle fibre muscolari sono incapaci di replicare essendo fuoriusciti dal ciclo cellulare in maniera irreversibile e trovandosi in stato postmitotico permanente.

Le cellule satelliti sono cellule mononucleate, normalmente quiescenti (ossia non replicanti), situate nello spessore del sarcolemma, tra la membrana plasmatica della fibra muscolare e la lamina basale; in questa sede non esprimono caratteristiche differenziative di una fibra muscolare. In seguito ad una lesione che comporti la perdita o la degenerazione della fibra muscolare, la cellula satellite è stimolata a replicare formando una progenie di cellule che sono in grado di ripetere un processo miogenico analogo a quello svolto dai mioblasti durante lo sviluppo embrionale del muscolo. Dopo un certo numero di mitosi, queste cellule si fondono tra loro formando strutture sinciziali che sono in grado di esprimere i prodotti differenziati propri delle fibre e di ricostituire l'integrità del tessuto.

2.3) Il processo produttivo

L'abbondanza della ricerca che avviene nel campo dell'ingegneria dei tessuti ha come conseguenza una grande sviluppo nell'ambito nella ricerca e produzione di carne sintetica. Tuttavia, i campi dell'ingegneria tissutale biomedica e della carne sintetica applicano soluzioni simili a problemi molto diversi, difatti i due campi operano con vincoli differenti, alcune di queste differenze sono qualitative come ad esempio il sapore, altre sono semplicemente quantitative come i costi sia di produzione che della vendita del prodotto finito (la Tabella 2.1 riassume alcune delle principali differenze).

Per la produzione di carne sintetica esistono tipologie di approccio; dall'alto verso il basso in cui vengono seminate cellule all'interno di scaffold, il quale viene irrorato per consentire la migrazione cellulare e la formazione di ECM, diversamente in un approccio definito dal basso verso l'alto, le unità modulari più piccole come fogli carichi di cellule, tubi, sfere, organoidi o altre microstrutture possono essere utilizzate come elementi costitutivi per l'assemblaggio [51]. La selezione dell'approccio di fabbricazione dipenderà da una varietà di parametri come il tipo di prodotto, la struttura, la consistenza e quanto sia adattabile l'approccio allo scale-up commerciale [40]. Alcuni approcci che sono efficaci per le applicazioni biomediche saranno probabilmente impraticabili per la produzione di carne da laboratorio, altri che si sono rivelati insufficienti nell'ambito biomedico potrebbero invece rivelarsi vincenti la produzione alimentare [52].

| Specifiche | Carne coltivata | Ingegneria dei tessuti |
|--|--|---|
| Caratteristiche del tessuto produrre | La consistenza, il sapore, il colore, le proprietà di cottura e i valori nutrizionali del prodotto finale sono caratteristiche chiave e devono imitare accuratamente quelli della carne convenzionale. Queste caratteristiche possono essere influenzate dalla presenza, dall'organizzazione e dalla funzione delle proteine contrattili [41]. Il grasso intramuscolare influisce sul sapore e sulla consistenza del prodotto [83]. | Il costruito deve essere biocompatibile, in grado di integrarsi nel tessuto ospite, e una volta impiantato deve presentare la funzionalità biologica appropriata. Nel caso del tessuto muscolare deve presentare la capacità di contrarsi in risposta all'input neurale [84]. |
| Costo e scala di produzione | Si desidera una produzione su larga scala, i costi elevati limiterebbero fortemente le dimensioni potenziali del mercato, mentre i prodotti moderatamente costosi possono avere maggior successo per l'ingresso sul mercato. L'obiettivo finale è la parità dei prezzi con la carne ottenuta tramite macellazione. Saranno necessarie catene di fornitura affidabili, a basso costo e materiali per scaffold facilmente ottenibili [85]. | Si richiede un alto grado di personalizzazione, che spesso include cellule autologhe. Scaffolds, materiali e costi di produzione elevati sono più tollerabili in questo tipo di mercato. |
| Vitalità post-raccolta | La vitalità post-raccolta non è importante se non nella misura in cui influisce sulle proprietà del prodotto rilevanti al fine alimentare. | I tessuti ingegnerizzati devono mantenere la vitalità e la funzionalità a lungo termine dopo la raccolta e l'impianto. |
| Idoneità del materiale sintetico o di origine animale | L'uso di materiali sintetici è limitato a causa della necessità di scaffolds commestibili o rapidamente biodegradabili, a meno che il materiale non sia completamente rimosso dal prodotto finale [86]. I materiali di origine animale sono generalmente considerati inaccettabili, anche se le versioni ricombinanti degli stessi materiali possono essere un'opzione attraente. | I materiali sintetici sono attraenti grazie alla loro capacità di controllare con precisione le loro proprietà e lo stimoli-responsive. I materiali di origine animale sono considerati accettabili e sono spesso preferibili a causa della loro biocompatibilità [84]. |
| Profilo di degradazione di materiali per scaffold | Gli scaffold devono biodegradabili in tempi brevi durante la fase di differenziazione e maturazione oltre ad essere commestibili. Il costrutto e i suoi prodotti di degradazione, se presenti nel prodotto finale, devono essere atossici anche se consumati regolarmente e non devono avere un impatto negativo sul sapore o sulla consistenza [86]. Se lo scaffold è destinato a rimanere all'interno del prodotto finale, le sue proprietà strutturali dovrebbero imitare l'ECM, compresi i cambiamenti esibiti durante il processo di cottura. | Materiali biodegradabili sono preferibili, si richiede inoltre un processo di degradazione che avvenga in tempi medio/lunghi e a pari passo con la rigenerazione del tessuto. Lo scaffold o i suoi prodotti di degradazione non devono essere dannosi per il paziente. Il dosaggio di materiali il cui utilizzo in certe quantità potrebbe portare a complicazioni deve essere accuratamente valutato tramite test fatti in precedenza [87-88]. |
| Specie bersaglio | Le specie bersaglio principali sono le specie di bestiame comuni (ad esempio, mucca, pollo, maiale) e le specie ittiche comunemente consumate (ad esempio, gamberetti, salmone, tonno). Le specie di destinazione possono anche includere altre specie che sono meno consumate nei tempi odierni ma il loro utilizzo potrebbe crescere in futuro, quindi, c'è la necessità di sviluppare metodi e protocolli che possono essere applicati in un'ampia varietà di specie. | Gli esseri umani sono la specie bersaglio principale, con alcune ricerche anche su roditori e altri mammiferi. |

| | | |
|---|---|--|
| Considerazioni relative al sistema immunitario | Gli allergeni comuni dovrebbero idealmente essere evitati nel medium e negli scaffold, e devono essere chiaramente segnalati se usati. Poiché il prodotto è destinato ad essere consumato piuttosto che impiantato, le considerazioni relative al sistema immunitario sono in gran parte simili a quelle di altri prodotti alimentari. | Il costruito deve poter essere impiantato senza innescare una risposta immunitaria rilevante. Bisogna considerare potenziali risposte immunitarie o fibrotiche allo scaffold. L'uso di cellule derivate dal paziente risulta essere l'opzione più adatta. [84]. |
| Metodi di raccolta | I prodotti CM intatti e differenziati devono essere raccolti ad alta frequenza e in grandi volumi. Le tecnologie esistenti per la raccolta di grandi volumi di cellule, come le centrifughe, possono non essere appropriate per i tessuti differenziati o i prodotti interi tagliati. Nuove tecnologie di raccolta che si integrano nei bioreattori e bioprocessi, sono suscettibili per un'eventuale una produzione su scala e automazione del processo, bisogna inoltre considerare la sicurezza alimentare e le caratteristiche appropriate per l'imballaggio del prodotto [89]. | È probabile che vengano raccolti tessuti ingegnerizzati per il trapianto in volumi ridotti e può richiedere la personalizzazione a seconda della popolazione di pazienti o dell'applicazione. C'è una bassa tolleranza per i danni ai tessuti o agli scaffold durante la raccolta. Pertanto, le interfacce reattive agli stimoli possono essere favorevoli ai metodi di raccolta enzimatica o meccanica. Tuttavia, questi metodi possono limitare la raccolta ai tessuti sottili [90]. |
| Ossigeno, nutrienti, e trasporto di rifiuti | Durante il periodo di coltura, il tessuto deve essere sufficientemente permeabile all'ossigeno, ai nutrienti e ai prodotti di scarto per sostenere il metabolismo cellulare. Una vascolarizzazione basata sulle cellule non è un requisito accettabile. Le esigenze metaboliche e le condizioni ambientali del tessuto sono più prevedibili e controllate di quelle che in vivo il tessuto muscolare incontrerebbe [52]. | La vascolarizzazione del tessuto è necessaria per mantenere la vitalità prima e dopo l'impianto così come la connessione alla vascolarizzazione ospite. Il tessuto deve essere sufficientemente vascolarizzato per sostenere i livelli di attività metabolica previsti in vivo [91-92]. |

Tabella 2.1 Differenze tra ingegneria dei tessuti e produzione carne sintetica

La produzione di carne in coltura può essere definita da 4 fasi riassunte in Figura 2.3, la fase iniziale del processo di produzione prevederà l'isolamento e caratterizzazione delle cellule delle specie di interesse.

Per la raccolta cellulare vengono utilizzati tre metodi [53]:

- (1) Una biopsia cellulare o tissutale viene acquisita da un animale vivo o recuperata post mortem. Le cellule acquisite in questo modo sono chiamate linee primarie.
- (2) Vengono utilizzate cellule pluripotenti, come cellule staminali embrionali o cellule staminali pluripotenti indotte
- (3) Linee cellulari immortali.

Nella fase II, le cellule vengono espanse mantenendo le cellule in uno stato indifferenziato e quindi proliferativo. Nella fase III, la maturazione dei tessuti, le cellule vengono coltivate in condizioni che promuovono la differenziazione e la maturazione delle cellule, tipicamente su scaffold. La scelta del mezzo e del bioreattore è cruciale in entrambe le fasi II e III e

probabilmente differirà tra le due fasi. Per alcune tipologie di prodotto sarà necessaria una fase di lavorazione finale per trasformare i tessuti ingegnerizzati in un prodotto finale [40]. Ad esempio, scaffold carichi di miofibre mature potrebbero essere combinati con microcarrier commestibili su cui gli adipociti sono stati differenziati in un processo separato di fase III per formare un hamburger. In alternativa, più tipi cellulari possono essere differenziati sugli stessi scaffold, che vengono poi combinati per formare il prodotto finale, oppure possono essere impilati fogli privi di scaffold (in cui le proteine ECM secrete prendono il posto dello scaffold). Ulteriori variazioni su questo schema generale potrebbero combinare le fasi II e III o potrebbero evitare la necessità della fase IV facendo maturare i tessuti su un'impalcatura più grande che viene raccolta e lavorata direttamente allo stesso modo della carne convenzionale [40].

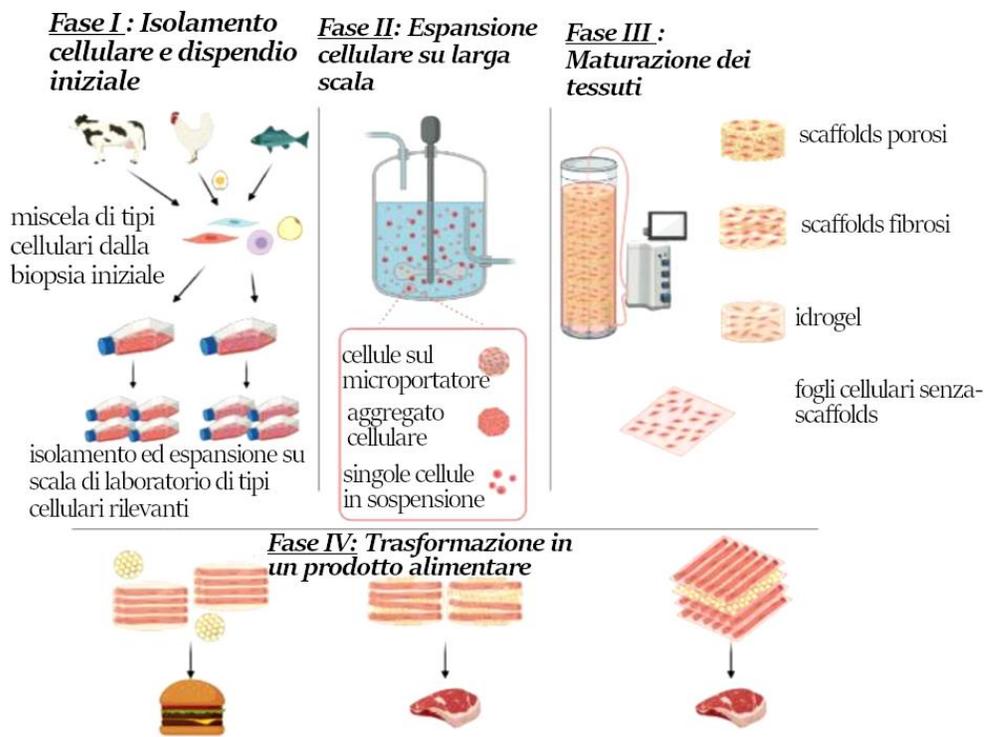


Figura 2.3 Fasi per la produzione di carne sintetica

2.3.1) Proliferazione

Le cellule sono inizialmente lasciate proliferare in flask, questo metodo rappresenta lo standard per i metodi di coltura cellulare di laboratorio, principalmente dedicati alle attività di ricerca. Tuttavia, per la produzione industriale di cellule su larga scala, sono necessarie colture all'interno di bioreattori per aumentare l'efficienza del processo: questi sistemi richiedono la generazione di un gran numero di cellule con un consumo minimo di energia e risorse (es. mezzo di coltura, materiali di consumo), tempo e le fasi di gestione [53]. L'attuale metodo di coltura cellulare prevede l'uso di mezzi di crescita specifici, che contengono tutte quelle sostanze necessarie per garantire la proliferazione cellulare come glucosio, sali inorganici, aminoacidi, vitamine, fattori di crescita, antibiotici e antimicotici, per garantire una rapida crescita cellulare [54].

2.3.2) Scaffold

I processi di fabbricazione e maturazione dei tessuti possono essere realizzati solo se le cellule sono dotate dell'ambiente corretto in cui possono aderire, proliferare e differenziarsi. Gli scaffold sono strutture tridimensionali caratterizzate da corretta porosità, architettura della trama e proprietà meccaniche e chimiche adatte alla maturazione di specifici tipi cellulari. Inoltre, considerando gli scopi dell'ingegneria alimentare, gli scaffold devono essere biodegradabili e commestibili, la loro struttura è coinvolta anche nelle proprietà organolettiche finali del prodotto finale. L'approccio tradizionale, basato sull'ingegneria dei tessuti, prevede la fabbricazione di scaffold e la successiva semina cellulare in una coltura 3D [55,56], Gli scaffold più semplici sono i microcarrier, tipicamente utilizzati per la proliferazione cellulare su larga scala. Per la maturazione dei tessuti, la maggior parte degli scaffold possono essere classificati come scaffold porosi, idrogel o scaffold fibrosi. Sebbene sia gli scaffold porosi che quelli fibrosi contengano spazi vuoti attraverso i quali i mezzi possono circolare, differiscono nella struttura, con gli scaffold porosi aventi una struttura spugnosa e gli scaffold in fibra composti da fibre lunghe e sottili, tipicamente gli scaffold in fibra sono prodotti mediante elettrofilatura. Possono essere utilizzati anche approcci senza scaffold come i metodi basati su fogli cellulari [40,57]. Nelle

seguenti 3 tabelle successive si vuole riportare in modo sintetico i vantaggi e gli svantaggi per le principali tipologie di scaffold (Tabella 2.2), i criteri di design desiderati per lo scaffold (Tabella 2.3) ed infine vantaggi e svantaggi di alcune classi di materiali (Tabella2.4).

| Tipo di scaffold | Vantaggi | Svantaggi e incertezze |
|------------------------|--|---|
| Microcarrier | I microcarrier sono semplici da produrre e consentono una scala efficiente su cellule in grado di aderire su superfici [93-94]. | L'uso di microcarrier non commestibili richiederà una fase di dissociazione, che probabilmente aumenterà i costi e potrebbe introdurre problemi di sicurezza [93-94]. |
| Scaffolds porosi | Gli scaffolds porosi possono essere prodotti relativamente facilmente ed economicamente e fornire una struttura robusta per la crescita delle cellule e la distribuzione delle dimensioni dei pori può essere sintonizzata per polarizzare simultaneamente la differenziazione cellulare nella direzione desiderata e facilitare il trasporto sufficiente di ossigeno, nutrienti e rifiuti [95]. | Mentre gli scaffolds porosi possono mostrare un certo grado di anisotropia, facilitando così l'allineamento delle fibre muscolari, molti tipi di scaffolds porosi possono essere meno adatti degli scaffold fibrosi per quanto concerne l'introduzione di una forte e larga direzionalità del tessuto, come sarebbe auspicabile per alcuni prodotti a base di carne intera [96-97]. |
| Scaffolds fibrosi | Gli scaffolds fibrosi sono adatti al compito di indurre l'allineamento delle fibre muscolari, ed è relativamente semplice da produrre uno scaffold con forte anisotropia lungo l'intero costruito. Le tecniche di filatura possono essere applicate a una varietà di biomateriali [98]. | È necessario lo sviluppo di versioni altamente scalabili di tecniche di filatura adatte alla produzione di scaffolds a costi e scala richiesti dall'industria CM [99-100]. |
| Idrogel | Gli idrogel imitano la struttura della ECM naturale, che è un vantaggio per la compatibilità cellulare. In molti casi, essi richiedono anche poco materiale in relazione alle dimensioni del costruito, il che significa che i costi più elevati su una base di peso a secco può essere tollerabile [101-102-103]. | Gli idrogel sfusi, cioè quelli fusi in forma solida e non utilizzati come materiale di base per scaffolds porosi a base criogenica o per bioprinting, non presentano intrinsecamente alcun tipo di anisotropia o patterning [104-105]. |
| 3D Bioprinting | Il Bioprinting può essere usato per produrre le strutture definite ad una varietà di scale, con controllo preciso sopra il posizionamento di cellule e bioinchiostri [106-107-108]. | Esiste un compromesso tra la risoluzione di stampa e la velocità, il che implica che la risoluzione ottenibile su scala può essere inferiore a ciò che è possibile in teoria [109]. |
| Approcci scaffold free | Gli approcci senza scaffolds basati su fogli cellulari o organoidi non introducono alcun materiale esogeno dello scaffold ma dipendono piuttosto dalle celle per secernere il loro proprio ECM. Ciò può presentare vantaggi dal punto di vista normativo e può contribuire a una migliore somiglianza organolettica e nutrizionale con la carne convenzionale [110]. | Questi approcci sono stati finora meno studiati rispetto agli altri qui descritti, e quindi c'è un maggior grado di incertezza sulla loro idoneità. In particolare, la scalabilità può essere una sfida significativa [111]. |

Tabella 2.2 Vantaggi e gli svantaggi per le principali tipologie di scaffold.

| Criterio di progettazione | Valore desiderato | Motivazione |
|---------------------------|---|---|
| Proprietà di adesione | Il tasso di adesione delle cellule utilizzate deve essere il più alto possibile, idealmente >90. Se il materiale è usato come un microcarrier e non incluso nel prodotto finale, sono richiesti metodi di distacco efficienti e non tossici [112,113]. | La proliferazione cellulare su larga scala è stata identificata come un probabile contributo sostanziale al costo e all'impatto ambientale della produzione di CM. Bassi tassi di adesione porteranno a inutili sprechi di cellule, aumentando il costo complessivo e l'impatto ambientale, e quindi non sono accettabili. A seconda dell'applicazione prevista dallo scaffold, esso deve essere compatibile anche con elevati tassi di proliferazione e garantire un'efficace differenziazione e maturazione [112,113]. |
| Costo | Il più basso possibile, idealmente <USD \$0.10 per kg di prodotto finale [114]. | Per raggiungere una penetrazione sostanziale del mercato, CM deve essere competitivo con i prezzi delle carni di base di circa USD \$ 2 per kg. Considerando le sfide associate al processo di produzione, è corretto supporre che lo scaffold dovrebbe contribuire molto poco al costo di produzione, forse <5% del costo di produzione. Il prezzo per kg dello scaffold può essere superiore a questo, a seconda della massa del ponteggio necessaria per produrre 1 kg di prodotto. Naturalmente, prezzi notevolmente più elevati possono essere tollerabili a breve termine o per i prodotti premium [114]. |
| Profilo di degradazione | A meno che commestibile o rimovibile, la degradazione completa dello scaffold è richiesta in 2-3settimane, ma dipende dalla lunghezza del processo e dal periodo di invecchiamento post-raccolta [114]. | Se la degradazione è prevista, deve essere completata in un tempo inferiore al periodo di coltura più il periodo di invecchiamento post-raccolta (se presente). È inoltre necessario che il processo di degradazione non produca sottoprodotti dannosi all'interno del prodotto finale. Qualsiasi materiale dello scaffold destinato a rimanere nel prodotto deve essere idoneo come alimento, cioè non tossico e sicuro per gli alimenti, garantendo il mantenimento delle proprietà organolettiche e nutrizionali (anche dopo la cottura). Questo requisito non si applica agli scaffolds dai quali verranno rimosse le cellule, come i microcarrier [114]. |
| Porosità | 80-90%, anche superiore se non compromette le proprietà meccaniche dello scaffold, le quali comunque sono limitate al mantenimento della struttura durante il processo di proliferazione cellulare, continuando a garantire supporto fino a quando pian piano verrà sostituito dalle cellule [52,97,115,116]. | Zeltinger et al. hanno scoperto che la semina cellulare per diversi tipi di cellule era più uniforme su scaffolds con una porosità del 90% rispetto al 70%. Ben-Arye et al. hanno dimostrato la proliferazione e la differenziazione delle cellule miogeniche su impalcature con porosità del 42% e del 56%. MacQueen et al. producevano impalcature fibrose con una porosità del 30-55% e sono stati in grado di far crescere e differenziare con successo le cellule miogeniche del coniglio su |

| | | |
|--------------------------------------|---|---|
| Dimensioni e spessore dello scaffold | Dipendente dal prodotto, ma almeno alcuni prodotti richiedono scaffolds di diversi centimetri di spessore nelle tre dimensioni [52,97,116]. | Gli scaffolds destinati a processi che includono una fase di fabbricazione post-raccolta possono essere di piccole dimensioni, ma per quelli in cui un intero taglio di carne deve essere coltivato in un unico pezzo, lo scaffold dovrà avere almeno le dimensioni del prodotto previsto senza sacrificare la capacità di ossigeno, nutrienti e trasporto dei rifiuti [52,97,116]. |
| Modulo di Young | 12-21 kPa per le cellule miogeniche, 2-3 kPa per le cellule adipogeniche, eventualmente inferiore [101,117-120]. | Boonen et al. hanno osservato una maggiore maturazione delle cellule miogeniche primarie coltivate su 21 kPa gel al contrario di 3 kPa gel. Engler et al. hanno scoperto che la rigidità ottimale per la differenziazione e la maturazione di Myotube era di 12 kPa, simile alla rigidità del tessuto muscolare, mentre i substrati di 1, 8 o 17 kPa non supportavano la striatura di Myotube. Ansari et al. hanno osservato una migliore differenziazione miogenica degli MSC (come valutata dall'espressione MyoD) coltivati su idrogel di alginato di 15 kPa rispetto a quelli di 5, 30 o 45 kPa. Freeman e Kelly hanno scoperto che i gel con il modulo di Young di 5-7 kPa hanno favorito la differenziazione osteogenica piuttosto che adipogenica nei MSC, mentre i gel più morbidi con un modulo di 2-2,5 kPa hanno indotto un numero approssimativamente uguale di cellule ad adottare ogni destino. Chandler et al. hanno osservato una migliore differenziazione adipogenica nelle cellule coltivate su idrogel con un modulo aggregato di 3 kPa rispetto a gel più rigidi con un modulo di 8 kPa o più. Poiché la prova è stata eseguita in confinamento radiale, si può presumere che il modulo aggregato sia approssimativamente uguale al modulo di Young. Per i materiali anisotropici, i moduli di Young possono differire sostanzialmente a seconda della direzione in cui il materiale è compresso, e in questi casi possono essere appropriati moduli di Young molto più grandi [101,117-120]. |

Tabella 2.3 criteri di progettazione dello scaffold.

| Materiale | Vantaggi | Svantaggi e incertezze |
|---|---|---|
| Polimeri sintetici | I polimeri sintetici hanno proprietà sintonizzabili e possono essere utilizzati in molteplici configurazioni di scaffold. Inoltre, hanno un'elevata consistenza batch-to-batch e bassi costi di produzione [121-122-123]. | Molti materiali sintetici non sono commestibili o biodegradabili, mentre altri hanno una degradabilità lenta o profili di degradazione sconosciuti. Questi materiali sono attualmente adatti come microcarrier o altri scaffolds temporanei, mentre la loro applicabilità come scaffolds integrati è incerta e dipende dalla capacità di accelerare il profilo di degradazione e garantire la sicurezza in ambito alimentare [121-122-123]. |
| Peptidi auto-assemblanti | I peptidi auto-assemblanti sono in grado di imitare l'architettura nativa ECM e si assemblano naturalmente in matrici nanofibrose. Essi sono versatili e possono essere utilizzati per i metodi di produzione di scaffolds convenzionali, come parte di bioinchiostri per la produzione additiva, o come rivestimenti per aiutare nella proliferazione delle cellule su larga scala [124-125]. | L'applicazione dei peptidi auto-assemblanti in CM rimane da valutare nella letteratura scientifica pubblicata ed è in minima parte studiata per l'ingegneria tissutale. Le attuali strategie di produzione sono costose e potrebbero compromettere la sua applicazione in CM [124-125]. |
| Molecole ECM | Le molecole di ECM offrono un ambiente più simile a quello che si ha nei tessuti presenti nel corpo, oltre a facilitare il fissaggio delle cellule. Le combinazioni di proteine ECM senza animali e di materiali vegetali a basso costo o di altro tipo possono essere un mezzo efficace per sfruttare le proprietà volute di questi materiali in un costo inferiore [125-126]. | Le molecole di ECM animale-derivate sono inadatte per uso in CM, mentre l'espressione ricombinante ed altre strategie dovranno ridurre drasticamente i costi ed aumentare la scala per essere una valida opzione per la produzione di CM [125-126]. |
| Materiali di origine vegetale e fungina | Alcuni materiali vegetali decellularizzati o minimamente lavorati, hanno caratteristiche strutturali intrinseche che si prestano ad essere utilizzati in CM. Ad esempio, la forte anisotropia di sedano, bulbi di cipolla verde, e l'erba, la vascolarizzazione ben sviluppata di foglie di spinaci, rendono questi materiali candidati promettenti. In alternativa, la materia vegetale può essere utilizzata in forme più elaborate, ad esempio, per l'elettrofilatura. Alcune piante hanno dimostrato di supportare efficacemente l'adesione cellulare senza funzionalizzazione [101,127,128]. | Dovranno essere sviluppati metodi di decellularizzazione che non aumentino in modo sostanziale i costi o gli impatti ambientali e che non introducano problemi di sicurezza. È probabile che l'uso di specie vegetali sia limitato a quelle che possono essere prodotte in modo estremamente economico e su larga scala, poiché molte delle piante che sono state testate sono anche quelle per le quali esiste un mercato per il consumo diretto da parte dell'uomo [101,127,128]. |

Tabella 2.4 Vantaggi e svantaggi per l'utilizzo di varie classi di materiali per la produzione di carne ingegnerizzata.

2.3.3) Biofabbricazione

Recentemente, un altro approccio sta acquisendo importanza: la biofabbricazione, questo processo consente la produzione di costrutti carichi di cellule utilizzando materiali contenenti cellule miste e molecole biologiche. Il principale vantaggio è la possibilità di fabbricare strutture più spesse e di controllare la disposizione spaziale delle cellule, anche di più tipi, che sono i maggiori limiti dei metodi di scaffolding convenzionali [58]. La biostampa 3D (3DBP) è una tecnologia di biofabbricazione basata sulla produzione additiva (AM) che consente il posizionamento preciso delle cellule, la deposizione della densità e il controllo preciso della struttura e il rapporto tra diverse popolazioni in caso di costrutti multicellulari. Le miscele di materiale cellulare utilizzate nel processo sono chiamate bioinchiostri [59]. Il 3DBP rappresenta un possibile punto di svolta nel campo della produzione di carne in vitro, garantendo un'elevata scalabilità, un processo privo di complessità, un dispendio energetico minimo e minori emissioni. I principali metodi di bioprinting sono basati su estrusione, getto d'inchiostro, stereolitografia e metodi basati su laser e luce [53].

2.3.4) Differenziazione dei tessuti e bioreattori

Qualunque sia la fabbricazione del costrutto, le cellule seminate all'interno dello scaffold 3D devono essere collocate in un bioreattore per la maturazione, i bioreattori sono sistemi chiusi e automatizzati in cui le cellule possono proliferare, differenziarsi e maturare all'interno del costrutto che forma il tessuto.

Sono necessari stimoli meccanici, chimici ed eventualmente elettrici per completare questa fase attraverso sistemi di coltura dedicati. I bioreattori forniscono un controllo preciso su variabili rilevanti come temperatura, concentrazioni di ossigeno, pH e densità cellulare. Vengono utilizzati diversi tipi di bioreattori, i più comuni sono colture statiche, matracci rotanti e bioreattori di perfusione (ad esempio, serbatoio agitato o parete rotante). All'interno dei bioreattori, le cellule attraversano la proliferazione e la differenziazione [60]. L'ultimo processo viene attivato modificando lo scaffold e il terreno di coltura e mediante l'aggiunta di elementi come proteine, aminoacidi e minerali. La mancanza di adesione cellulare e la creazione di strutture adatte alla crescita cellulare sono i punti critici di questa complessa procedura [53].

2.3.5) Dal laboratorio alla scala industriale

Il numero di cellule necessarie per produrre 1 kg di proteine dalle cellule muscolari è compreso tra $2,9 \times 10^{11}$ e 8×10^{12} [53]. Per raggiungere questi enormi numeri, è necessario che nei bioreattori su larga scala si verifichi uno stadio di proliferazione cellulare, tale che le cellule possano crescere e replicarsi nell'ordine di 5000 L [61]. Secondo Zidaric et al., i bioreattori saranno essenziali nel processo di produzione industriale della carne coltivata. Lo sviluppo dei tessuti richiederebbe almeno due diversi stadi: (i) la fase di proliferazione cellulare per fornire un numero sufficiente di cellule per la fabbricazione del costrutto (ad esempio, utilizzando un bioreattore a serbatoio agitato) e (ii) la differenziazione del tessuto in uno stadio (ad esempio, un'impalcatura porosa posta all'interno di un bioreattore di perfusione) che porterà al taglio finale della carne fornendo i giusti stimoli chimici, meccanici ed elettrici [53]. I prodotti e i processi esistenti nell'industria chimica e biomedica non soddisfano i requisiti per colture cellulari e tissutali su larga scala, principalmente in termini di costi e sostenibilità. Secondo Specht et al., esiste la prospettiva di sviluppare metodi e tecnologie per raggiungere l'obiettivo di carne pulita in vitro nel prossimo futuro [62]. Tuttavia, al di là dei requisiti industriali, le colture di carne di laboratorio di piccole dimensioni devono affrontare anche diverse sfide comuni. Le cellule utilizzate per la produzione di carne in coltura richiedono siti di ancoraggio per crescere e proliferare. Una soluzione a questo problema, soprattutto all'interno della stampa 3D e della biostampa, è la formulazione ottimale di biomateriali e bioinchiostri e la miscelazione di prodotti come polistirene, gelatina, collagene o additivi a base di proteine per fornire punti di adesione per le cellule, impedendo loro di rimanere sospeso all'interno del costrutto [53]. Tali siti di ancoraggio sono fondamentali per consentire alle cellule di crescere su scaffold e strutture strutturate in modo specifico per garantire la differenziazione delle cellule muscolari. Tali scaffold sono responsabili di garantire prodotti a base di carne in coltura con molteplici proprietà strutturali, inclusa la forma e la disposizione delle cellule. Ad oggi, una grande preoccupazione è che i prodotti di origine animale siano i più adatti ed efficienti per l'affinità e l'adesione cellulare, ma sono inadeguati nell'ottica di un metodo animal-free per il processo di coltura della carne. Inoltre, poiché il prodotto finale deve essere commestibile, le impalcature in tessuto, se non commestibili, devono essere almeno biodegradabili e non tossiche o in alternativa progettate per

essere rimovibili prima del consumo. Una volta raggiunta la maturità, il prodotto finale deve essere raccolto, il che aggiunge una fase al processo, aumentando la complessità della procedura. Questo passaggio può essere eseguito enzimaticamente, chimicamente o manualmente, i primi due metodi sono i più consigliati [63]. L'obiettivo principale della ricerca deve essere lo sviluppo e il miglioramento delle linee cellulari disponibili per creare colture cellulari e terreni di coltura, bioreattori, linee cellulari, impalcature e biofabbricazione.

La prima sfida che deve affrontare nella produzione di carne in coltura è la scelta dell'animale da cui eseguire la biopsia cellulare. La scelta non deve essere casuale, ma deve tenere conto di molteplici variabili, tra cui età, sesso e condizioni di allevamento, in quanto influenzano la presenza o l'assenza di cellule satelliti (cellule staminali del muscolo scheletrico adulto). Con l'invecchiamento dell'animale, la concentrazione di cellule satelliti all'interno del muscolo diminuisce. La diminuzione più rapida del numero di cellule satelliti si verifica soprattutto durante i primi mesi dopo la nascita. Inoltre, poiché le cellule satellite negli animali più giovani hanno subito meno divisioni cellulari mitotiche, potrebbero mantenere la loro capacità di differenziazione per un periodo proliferativo più lungo [64]. Il sesso degli animali è un altro fattore coinvolto nella proliferazione delle cellule staminali muscolari. Gli ormoni sessuali come estrogeni e testosterone sono in grado di influenzare la crescita cellulare. Rispetto alle femmine, gli animali maschi sono caratterizzati da un maggiore contenuto e attività di cellule satelliti, grazie all'influenza positiva del testosterone. Questa azione benefica è sottolineata anche da Mulvaney et al., che hanno dimostrato che gli animali castrati presentavano una minore concentrazione di attività delle cellule satelliti rispetto a quelli non castrati, tendenza invertita con la somministrazione di testosterone propionato [65]. Anche le condizioni di allevamento degli animali svolgono un ruolo importante nella composizione delle fibre muscolari. Vestergaard et al. hanno mostrato che gli animali allevati in modo estensivo avevano un numero maggiore di fibre muscolari di tipo I ma anche una riduzione delle fibre muscolari di tipo II rispetto agli animali allevati in modo intensivo. Questa differenza, secondo gli autori, è dovuta alle diverse diete a cui sono sottoposti gli animali; più precisamente, alla quantità di foraggio grezzo consumato, che è maggiore negli animali allevati in condizioni estensive [66].

2.4) Esempio di metodo di produzione della carne sintetica [29]

In questa sezione verrà presentato in modo dettagliato uno dei metodi principali utilizzato per la produzione di carne ingegnerizzata, il quale è stato il primo a fornire un risultato concreto per questo tipo di tecnologia rendendolo anche applicabile a livello industriale.

Attualmente le cellule bovine per la carne in coltura possono essere prodotte attraverso due approcci. Il primo prevede l'ottenimento di tessuti muscolari commestibili dai bovini in cui le loro cellule vengono separate in base al tipo in cellule satelliti muscolari, cellule staminali adulte e cellule staminali multipotenti, le quali vengono coltivate ed espanse per aumentarne il numero. L'altro metodo consiste nel trasformare le cellule somatiche in cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) e nel differenziarle nel tipo di cellula desiderato. Le cellule staminali primarie in coltura, in particolare le cellule satelliti muscolari, mantengono la loro capacità di differenziazione entro 10 passaggi e quindi hanno un numero limitato di divisioni, tuttavia sono sicure ed adatte ad essere consumate. La bistecca coltivata con una composizione e una struttura simili alla vera bistecca, comprendente principalmente cellule adipose e cellule muscolari allineate, risulta ancora impegnativa per quanto riguarda la sua produzione. Come soluzione potrebbero essere applicate varie tecniche di ingegneria dei tessuti, come l'ingegneria del foglio cellulare, l'ingegneria delle fibre cellulari, la coltura cellulare su un'impalcatura stampata in 3D e la stampa cellulare 3D, allo scopo di imitare caratteristiche strutturali della bistecca. Tra questi, la stampa cellulare 3D è promettente grazie ai suoi vantaggi di scalabilità e controllabilità della struttura e della composizione. In particolare, è degna di nota una tecnica di stampa 3D assistita da bagno (SBP) in cui l'inchiostro viene erogato all'interno di un gel o una sospensione con tixotropia. Sotto le forze di taglio, la viscosità di un gel o di una sospensione diventa di bassa viscosità, consentendo l'erogazione dell'inchiostro, e ritorna ad una viscosità elevata quando la forza di taglio viene rilasciata, mantenendo la forma stampata.

La carne presente in una bistecca ha una struttura allineata di fasci muscolari scheletrici con un diametro da circa 900 μm a 2,3 mm, a seconda dell'età e dalla parte del corpo dell'animale, formati da fibre muscolari scheletriche assemblate, collegate al tendine per i suoi movimenti di

contrazione e rilassamento. Le fibre muscolari sono ricoperte da membrana basale e i fasci muscolari sono circondati da grasso insieme ai capillari sanguigni (Figura 2.4).

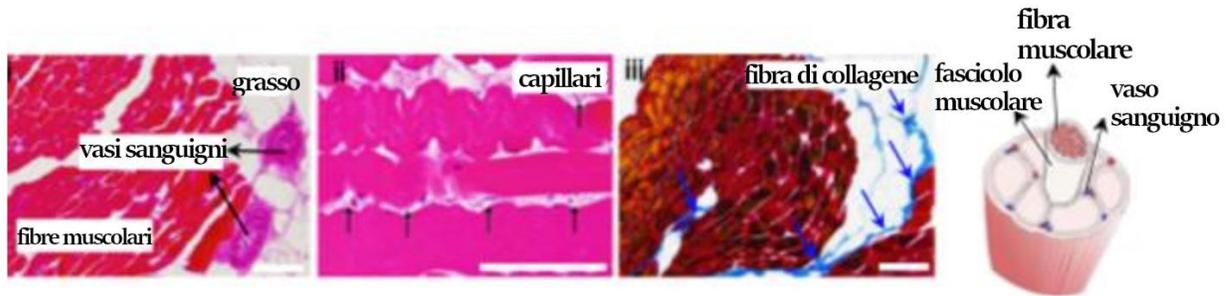


Figura 2.4 Struttura della bistecca.

Il rapporto dei componenti e la posizione del muscolo, dei tessuti adiposi e dei capillari sanguigni sono significativamente diversi a seconda del tipo di carne e del suo paese di origine. Ad esempio, la carne rossa nella groppa del Wagyu giapponese ha solo il 10,7% di tessuto adiposo, mentre il controfiletto del Wagyu ne ha il 47,5%. Di conseguenza, lo sviluppo di una metodologia per assemblare i tre tipi di fibre con la posizione, il rapporto e la quantità desiderati sarà una tecnologia chiave per la produzione di bistecche coltivate. Il metodo utilizzato odiernamente è costituito da una strategia in tre fasi per la costruzione di carne ingegnerizzata simile a una bistecca:

1. raccolta di cellule satellite bovine commestibili (bSC) e cellule staminali derivate da adiposo bovino (bADSC) da carni bovine e la loro successiva espansione,
2. sviluppo del bioprinting integrato tendine-gel (TIP) per la fabbricazione di fibre cellulari e la loro successiva differenziazione in fibre muscolari scheletriche, adipose e capillari sanguigni
3. assemblaggio delle fibre cellulari differenziate per costruire bistecche ingegnerizzate come la carne imitando le strutture istologiche di una vera bistecca di manzo (Figura 2.5).

Poiché il tendine è un tessuto chiave per l'allineamento e la maturazione delle fibre muscolari, è stato fabbricato un gel tendinei da TIP per consentire la loro connessione consecutiva con le fibre delle cellule muscolari, inducendo la formazione di fibre muscolari mature allineate.

Successivamente le fibre vengono assemblate per fabbricare carne simile a una bistecca ispirata alle immagini istologiche di una vera bistecca. TIP è un approccio efficace per la costruzione di carne simile a una bistecca ingegnerizzata con la posizione, il rapporto dei componenti e la quantità desiderati dei tre tipi di fibre.

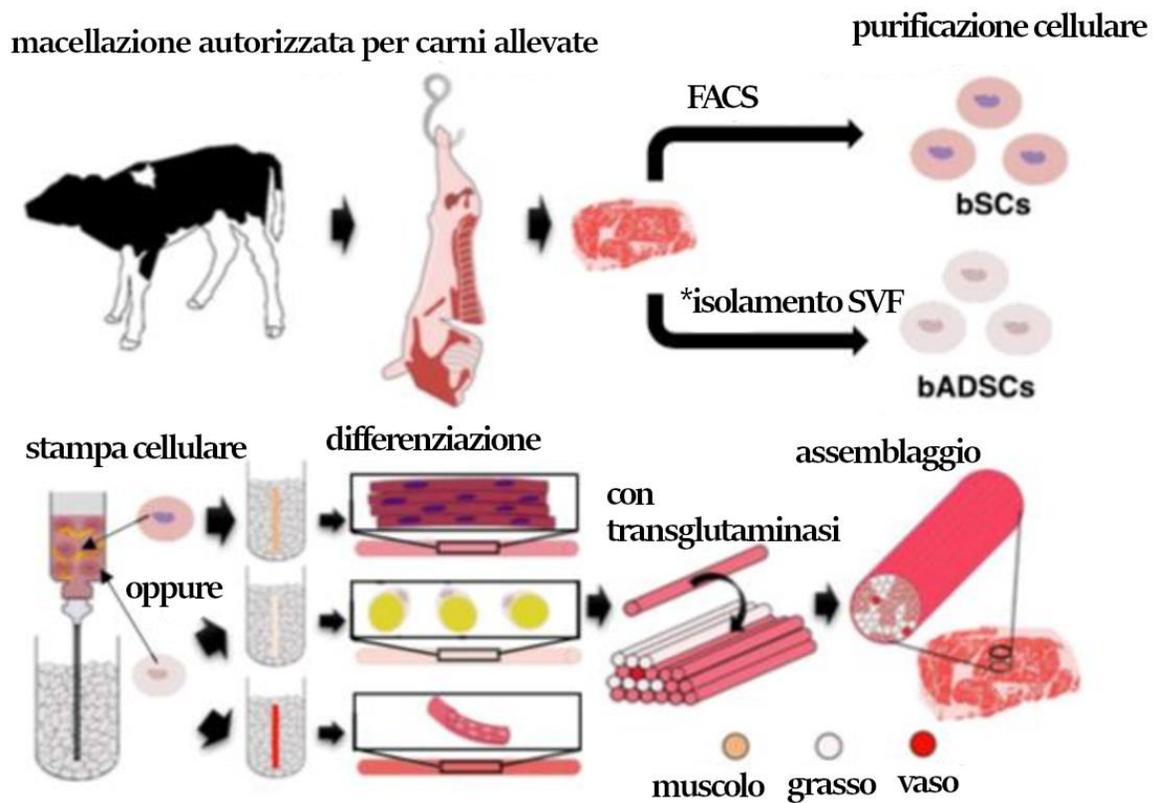


Figura 2.5 Schema del processo di produzione della bistecca ingegnerizzata.

2.4.1) Estrazione bSCs e bADSCs

Si procede all'isolamento delle bSC partendo da campioni di muscoli masseteri freschi, Il muscolo bovino appena raccolto viene lavato con etanolo freddo al 70% per 1 minuto, seguito da lavaggio di PBS freddo per 2 volte. Segue l'eliminazione della parte di tessuto adiposo mentre il muscolo rimanente viene tagliato e tritato e successivamente lavato con PBS freddo con 1% di penicillina-streptomina (PS) (Lonza, 17-745E) per 1 min. Il muscolo lavato viene poi miscelato

con 160 ml di collagenasi II allo 0,2% (Worthington, CLS-2) in DMEM (Invitrogen, 41966-29) integrato con PS all'1%. La miscela viene incubata e agitata ogni 10 minuti per 1,5 ore a 37°C. Dopo la digestione, vengono aggiunti 160 mL di FBS al 20% in DMEM integrato con PS all'1%. La soluzione mista viene centrifugata per 3 minuti a 80 giri al minuto (RPM) 4°C. I tessuti galleggianti nel surnatante dopo la centrifugazione sono rimossi con una pinzetta e il surnatante raccolto viene mantenuto in ghiaccio come sospensione di cellule mononucleate. I detriti precipitati sono miscelati con 80 ml di PS freddo all'1% in PBS e centrifugati per 3 minuti a 80 RPM 4 ° C. Il supernatante è stato nuovamente raccolto e miscelato con la precedente sospensione di cellule mononucleate. Il passo successivo prevede la filtrazione delle cellule attraverso un colino cellulare da 100 µm e alla loro centrifugazione per 5 minuti a 1500 RPM 4 ° C, le cellule sono poi sospese con 160 ml di DMEM freddo con 20% FBS e 1% PS, e filtrate nuovamente tramite un colino cellulare da 100 µm seguito da un colino cellulare da 40 µm. A seguito di una centrifugazione per 5 minuti a 1500 RPM 4°C, le cellule che precipitano vengono incubate con 8 ml di tampone di lisi degli eritrociti (ACK, 786-650) per 5 minuti in ghiaccio. Vengono lavate due volte con PBS 1x freddo integrato con PS all'1% e il pellet cellulare viene in seguito miscelato con supplemento FBS con dimetilsolfossido al 10% e quindi tenuto a -150 ° C. si procede poi con la sospensione in mezzo F10 (Gibco, 31550-023) contenente il 20% di FBS, 5 ng/mL di bFGF (R&S, 233-FB-025) e l'1% di PS integrato con 10 µM di p38i (Selleck, S1076) e quindi seminato a $1,1 \times 10^5$ cellule/pozzetto in piastre di coltura cellulare da 6 pozzetti (Corning) ricoperte con lo 0,05% di collagene bovino di tipo I (Sigma, C4243).

Le cellule vengono coltivate cambiando il mezzo ogni due o tre giorni e sono state fatte passare quando hanno raggiunto il 60% di confluenza fino al passaggio 3 per l'ordinamento cellulare mediante citometria a flusso. Le cellule sono state sospese in tampone FACS (1% BSA in PBS1x) e colorate con anticorpo APC anti-umano CD29 (BioLegend, 303008, TS2/16, diluizione 1/40), PE-CyTM7 anti-CD56 umano (BD, 335826, NCAM16.2, diluizione 1/40), FITC anti-pecora CD31 (BIO-RAD, MCA1097F, CO.3E1D4, diluizione 1/40) e FITC anti-pecora CD45 (BIO-RAD, MCA2220F, 1.11.32 , diluizione 1/40) per 30–45 min su ghiaccio al buio. Dopo l'incubazione con anticorpi, si ha nuovamente un lavaggio per due volte con PBS freddo e ricostituite in PBS con FBS al 2%. Le cellule CD31-CD45-CD56+CD29+ sono state isolate da Sony Cell Sorter SH800S come bSC. I tessuti adiposi bovini sottocutanei isolati vengono lavati

in PBS contenente il 5% di penicillina-streptomicina-amfotericina B (Wako, 161-23181). Vengono poi riempiti sei pozzetti da frammenti di tessuto in 2 ml di soluzione di collagenasi contenente entrambe le collagenasi di tipo I (Sigma Aldrich, C0130) e tipo II (Sigma Aldrich, C6885) a 2 mg/mL per ciascuno in DMEM con 1% di soluzione mista di antibiotici-antimicotici (Nacalai, 02892-54), 0% FBS e 5% BSA (sterilizzato con filtrazione a 0,2 μ m). Dopo un'ora di incubazione a 37 °C con agitazione a 250 giri/min, è stato aggiunto DMEM (Nacalai, 08458-16) con 10% di FBS e 1% di antibiotici e il lisato è stato filtrato utilizzando un filtro a rete di ferro sterilizzato da 500 μ m, prima di essere centrifugato per 3 min a 80 RPM. Lo strato superiore di adipociti umani maturi è stato quindi rimosso e il pellet contenente la frazione vascolare stromale (SVF) viene lavato due volte in PBS con 5% BSA e 1% di antibiotici e una volta in DMEM completo (10% FBS + 1% antibiotici), da 3 min di centrifugazione a 80 RPM tra ogni lavaggio. Infine, il pellet contenente le cellule SVF viene risospeso in DMEM e seminato in un piatto da 10 cm per l'espansione cambiando il mezzo ogni giorno per tre giorni e le cellule sono state fatte passare quando hanno raggiunto l'80% di confluenza. Dopo P1, le restanti cellule aderenti sono considerate come bADSC e sono state espanse in DMEM.

2.4.2) Fabbricazione di fibre muscolari bovine tramite bath-assisted 3D printing

Per organizzare le bSC isolate in una fibra cellulare, è stata utilizzata una stampa 3D bath-assisted (SBP) costituita da un bioinchiostro erogato all'interno di un bagno di supporto solitamente composto da una sospensione di idrogel che assicura la stabilità della struttura stampata nell'asse z. tramite questa tecnica attraverso la stampa cellulare viene garantita una shape-fidelity elevata anche su strutture complesse o morbide data dalla sua stabilità di stampa anche durante il funzionamento prolungato. Come materiali di supporto per il bagno vengono selezionate gelatina e gomma di gellano poiché possiedono una vasta gamma di proprietà compatibili con lo scopo prefissato per esempio sono commestibili, rimovibili e compatibili con le cellule. La gelatina è un gel a temperatura ambiente (RT) mentre è un liquido a 37 °C, pertanto è facilmente da rimovibile dopo la stampa mediante incubazione a 37 °C. Mentre l'idrogel di gomma di gellano si dissolve in tampone Tris-HCl 50 mM a pH 7,4 e a 37 °C³⁸. L'impasto liquido di idrogel viene fabbricato omogeneizzando l'idrogel sfuso di gomma di gellano e gelatina, in cui le dimensioni medie delle particelle sono rispettivamente di 44 μ m e 70 μ m.

Il bioink stampato è composto da bSCs, fibrinogeno e Matrigel nel mezzo di coltura nel bagno di supporto mescolato con particelle granulari di gelatina (G-Gel) o gomma di gellano (G-GG) e trombina per la fabbricazione di un fibra muscolare fibrosa che imita il fascio di fibre muscolari nella bistecca.

Il G-GG è stato prodotto preparando una gomma di gellano all'1% in peso (Sansho) in PBS, centrifugando a 2837 g per 3 minuti e rimuovendo il supernatante. G-Gel è stato prodotto preparando gelatina suina al 4,5% in peso (Sigma Aldrich, G1890) in DMEM contenente l'1% di soluzione mista antibiotico-antimicotica e il 10% di FBS, mantenendola a 4 ° C per 12 ore in modo da garantire la gellificazione, aggiungendo poi lo stesso volume di DMEM al gel di gelatina si procede con la centrifugazione a 2837 g per 3 min in modo da rimuovere il supernatante.

Il bioink è stato preparato per essere 5×10^7 cellule/mL di bSC nella miscela composta da 20 mg/mL di fibrinogeno (Sigma Aldrich, F8630) in DMEM e Matrigel (Corning, 356234) (6:4, v/v). Il bagno di supporto è stato preparato miscelando G-GG o G-Gel con 10 U/mL di trombina (Sigma Aldrich, T4648) prima della stampa. Dopo aver riempito il bagno di supporto preparato in una fiala di vetro e caricato la siringa contenente il bioink preparato sullo strumento erogatore (Musashi, Shotmaster 200DS), la stampa cellulare viene condotta all'interno del bagno di supporto mantenendo la siringa e le parti del letto dello strumento a 4 °C. Tutte le parti, come siringhe, ugelli e contenitori utilizzati per la stampa cellulare, vengono in precedenza sterilizzate con etanolo al 70% e trattamento UV. L'indicatore dell'ugello, la velocità di spostamento e la velocità di erogazione sono rispettivamente di 16 G, 1 mm/s e 2 μ L/s. Le strutture stampate all'interno dei bagni di supporto vengono incubate all'interno di un armadio sterile a temperatura ambiente per 1 ora per garantire la gelificazione. Dopo la gelificazione, il G-GG è stato rimosso pipettando e le strutture stampate sono state immerse in tampone Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) a 37 ° C per 30 minuti e lo stesso processo è stato ripetuto ancora una volta. G-Gel è stato sciolto per incubazione a 37°C per 2 ore. Le fibre cellulari ottenute dopo la rimozione dei bagni di supporto sono state coltivate nel mezzo di base delle bSC per 2-3 giorni e quindi sostituite con il mezzo di differenziazione. La coltura in sospensione è stata condotta posizionando la fibra cellulare stampata su una piastra di coltura tissutale e la coltura fissata con ago è stata eseguita fissando entrambe le estremità delle fibre cellulari stampate sulla gomma siliconica con una dimensione di 2 cm \times 2 cm \times 3 mm (L \times D \times H) posto su una piastra a sei pozzetti.

2.4.3) Fabbricazione di fibre cellulari muscolari, adipose e vascolari mediante TIP

La caratteristica principale della SBP modificata, denominata bioprinting tendine-gel-integrated (TIP), è l'introduzione di gel tendinei per ancorare le fibre cellulari stampate per la coltura. La Figura 2.6 illustra il processo del TIP in cui il bagno di stampa è diviso in tre parti: il gel tendineo inferiore, il bagno di supporto e il gel tendineo superiore. G-Gel viene utilizzato come bagno di supporto come descritto nella sezione precedente e il volume dei tendini gel viene riempito con una soluzione di nanofibre di collagene (CNF) al 4% in peso che ha una transizione sol-gel reversibile da 4°C a 37°C. Per separare gli strati e mantenere la struttura si fabbricano pozzi di polidimetilsilossano (PDMS). Dopo la gelificazione delle fibre bSC all'interno del pozzetto PDMS, l'incubazione per 2 ore a 37 °C ha indotto il bagno di supporto e i gel tendinei a diventare rispettivamente una soluzione e un gel, e il pozzetto PDMS è stato quindi inserito il mezzo di coltura.

Il 4% in peso di CNF è stato prodotto da spugna di collagene (Nipponham, miscela di tipo I e III) in base al metodo precedente. Dopo un taglio di una piccola area del lato dei pozzetti PDMS per creare il canale del flusso dei media, è stata sterilizzata con etanolo al 70% e trattamenti UV ed è stata quindi posta su un vetrino. Si procede riempiendo il pozzetto PDMS con il 4% in peso di CNF, G-Gel e il 4% in peso di CNF negli strati inferiore, medio e superiore, rispettivamente. La stampa cellulare è stata condotta allo stesso modo della SBP. Dopo aver stampato le cellule, l'area stampata nello strato superiore del pozzetto PDMS è stata coperta ancora una volta con il 4% in peso di CNF, incubata a temperatura ambiente per 1 ora; quindi, è stata incubata a 37 ° C per 2 ore per dissolvere il G-Gel e indurre la gelificazione dei CNF e, infine, viene posto in un contenitore di coltura. I bioinchiostri sono stati preparati allo stesso modo dell' SBP per la fibra delle cellule muscolari, mescolando 5×10^6 cellule/mL di bADSC in 1,2% in peso di CMF e Soluzione di fibrinogeno 20 mg/mL per fibre adipose e 107 cellule/mL di bADSC differenziate endoteliali in 1,2% in peso di CMF e soluzione di fibrinogeno 20 mg/mL per fibre vascolari in DMEM.

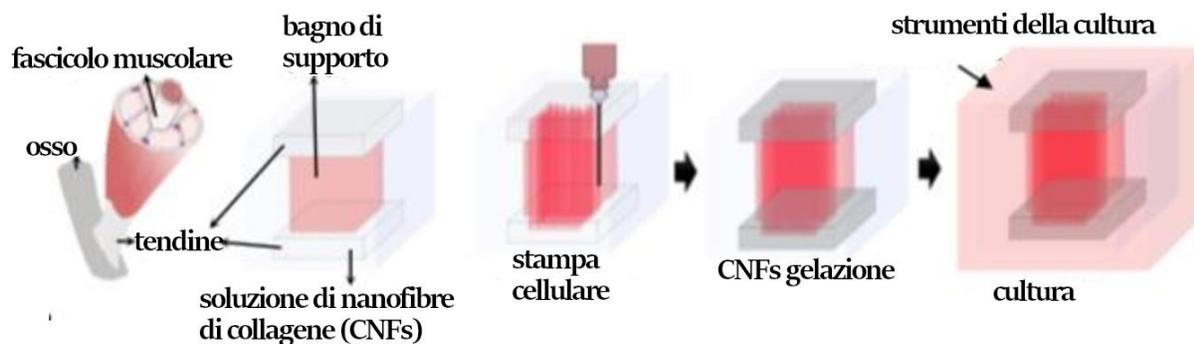


Figura 2.6 Rappresentazione dello schema del TIP per la stampa cellulare

2.4.4) Costruzione della bistecca mediante assemblaggio di fibre muscolari, adipose e vascolari.

Per imitare la struttura della carne bovina commerciale, viene utilizzata un'immagine in sezione trasversale con colorazioni sarcomeriche di α -actinina e laminina. La bistecca prodotta ha dimensioni di circa 5 mm \times 10 mm \times 5 mm (LxPxA). I diametri delle fibre cellulari ottenute da TIP vengono misurati e vengono calcolate il numero di fibre per tipo. Per distinguere ogni fibra cellulare, le fibre muscolari e vascolari si utilizzano colorante rosso usando colorante alimentare, lasciando la fibra delle cellule adipose di colore bianco. Dopo aver impilato fisicamente le fibre cellulari vengono trattate con transglutaminasi, che è un comune enzima di reticolazione alimentare, per accelerare l'assemblaggio per due giorni a 4°C. Il prodotto finale è mostrato in Figura 2.7.

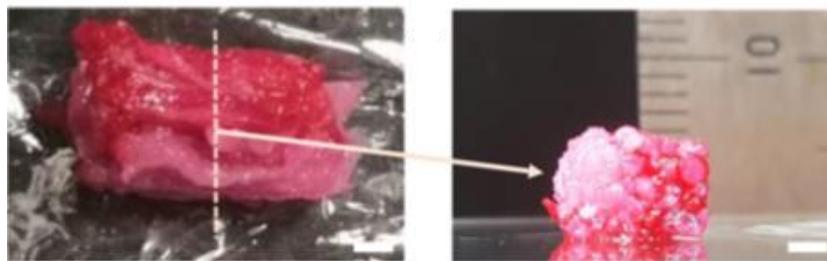


Figura 2.7 Risultato finale della bistecca ottenuta

Capitolo 3: Materiali e metodi

3.1) Considerazioni iniziali e analisi di fattibilità

Le considerazioni iniziali che sono state fatte sono relative alle valutazioni sulla fattibilità e le tempistiche dell'esperimento, come infatti riportato varie volte nelle sezioni precedenti per rendere competitiva la carne ingegnerizzata sul mercato è necessario rendere i costi dei prodotti paragonabili o inferiori a quelli derivanti dalla carne da macello. I fattori che possono influenzare i costi sono molteplici e vanno dai materiali utilizzati fino ai procedimenti eseguiti, nei quali i macchinari utilizzano varie risorse come, ad esempio, energia elettrica che grava sul bilancio finale.

Mentre la questione sui materiali e sul procedimento verrà ampiamente presentata nei punti successivi, in questa parte si vuole parlare del discorso tempo, ovvero in linea teorica, dopo quanto tempo posso ottenere un determinato volume di carne partendo da un numero iniziale di cellule staminali. Il fattore tempo è determinante per tagliare il prezzo sul prodotto finale poiché se in futuro si andasse ad utilizzare un sistema di produzione automatizzato in parallelo, in un certo periodo avrei più quantità di prodotto in un determinato periodo.

In seguito vengono espressi i calcoli relativi al tempo necessario per l'ottenimento di un volume di carne di dimensioni 10cm x 10cm x 1cm, paragonabile ad una bistecca di piccole dimensioni, ovviamente queste misure riferiscono ad un volume maggiore rispetto a quello che verrà prodotto durante l'esperimento, in quanto l'obiettivo dei ragionamenti che seguono erano relativi ad una valutazione nel caso di una produzione in ambito industriale.

Obiettivo: calcolare il tempo necessario affinché partendo da una piastra di Petri, al cui interno sono presenti cellule al 70% di confluenza, si possa raggiungere una numerosità di cellule tale da riempire completamente un volume di 10cm x 10cm x 1cm, il quale rappresenta la quantità di carne che si richiede di ottenere alla fine della prova.

Procedimento: come primo passo si vuole calcolare il numero di cellule che una piastra di Petri con diametro 100 mm è in grado di contenere. Per l'assegnazione delle dimensioni della cellula staminale è possibile fare un'approssimazione prendendo il valore medio presente in letteratura, si può quindi considerare come diametro medio 10 μm .

Da cui:

$$\text{Area piastra di Petri} = \pi * r^2 = \pi * 50^2 \text{ mm}^2 = \pi * 25 * 10^2 \text{ mm}^2$$

$$\text{Convertendo in } \mu\text{m}^2 \text{ si ottiene una area di: } \pi * 25 * 10^8 \mu\text{m}^2$$

$$\text{Area occupata da una singola cellula} = \pi * 5^2 \mu\text{m}^2 = \pi * 25 \mu\text{m}^2$$

Facendo il rapporto tra l'area della piastra di Petri e l'area occupata dalla cellula ottengo:

$$\frac{\pi * 25 * 10^8 \mu\text{m}^2}{\pi * 25 \mu\text{m}^2} = 10^8 \text{ cellule}$$

La quantità ottenuta rappresenta il numero massimo di cellule che la piastra di Petri presa in esame può contenere, tuttavia le cellule andranno prelevate al 70% della confluenza, questo comporta che il valore ottenuto diventa:

| |
|-------------------------|
| $0,7 * 10^8 = 7 * 10^7$ |
|-------------------------|

A questo punto si vuole capire quante cellule sono contenute nel volume del parallelepipedo:

$$\text{Volume del parallelepipedo} = 1 * 10 * 10 \text{ cm}^3 = 100 \text{ cm}^3$$

$$\text{Converto in } \mu\text{m}^3 \text{ ottenendo } 10^{14} \mu\text{m}^3$$

$$\text{Volume della cellula} = \frac{4}{3} * \pi * r^3 \mu\text{m}^3 \approx 4 * 5^3 \mu\text{m}^3 = 500 \mu\text{m}^3 = 5 * 10^2 \mu\text{m}^3$$

Attraverso il rapporto tra il volume del parallelepipedo e quello della cellula si trova $2 * 10^{11}$, ovvero la quantità di cellule contenute in 100 cm^3 .

Per ottenere il numero di divisioni cellulari tali da passare dalla quantità presente nella piastra di Petri a quella del volume è sufficiente applicare la seguente formula:

$$D = \frac{\ln\left(\frac{C_f}{C_i}\right)}{\ln(2)}$$

In cui per C_f si intende il volume di cellule finale, ovvero quelle presenti nel volumetto, mentre C_i è il volume di cellule iniziale, quindi quelle contenute nella piastra di Petri al 70% di confluenza.

$$D = \frac{\ln\left(\frac{2 \cdot 10^{11}}{7 \cdot 10^7}\right)}{\ln(2)} = 11,48 \text{ cioè } 12 \text{ divisioni}$$

Sapendo che il tempo per ogni divisione cellulare è di 24 ore, è quindi possibile conoscere che il tempo per passare dal numero di cellule iniziale a quello finale è di 12 giorni.

Si vuole considerare ora il tempo necessario per ottenere la quantità di cellule della piastra di Petri precedentemente calcolata, utilizzando una coltura di partenza di 100 cellule (un numero molto piccolo per considerare il caso pessimo).

Come in precedenza utilizzo la formula:

$$D = \frac{\ln\left(\frac{C_f}{C_i}\right)}{\ln(2)}$$

$$D = \frac{\ln\left(\frac{7 \cdot 10^7}{10^2}\right)}{\ln(2)} = 19,4 \text{ cioè } 20 \text{ divisioni}$$

Come esplicitato prima, sapendo che il tempo di duplicazione cellulare è di 24 ore, ottengo come tempo 20 giorni.

Conclusioni: da sole 100 cellule iniziali è possibile in 32 giorni ottenere una “bistecca” di 100 cm^2 , quindi questo non solo porta a concludere che in linea teorica è possibile partendo da pochissime cellule staminali, ottenere una struttura complessa in un tempo relativamente breve, ma anche che a livello industriale sarebbe possibile ottenere volumi decisamente più grandi in tempi competitivi rispetto ad un allevamento, per il quale sono necessari almeno 6 mesi per ottenere un bovino macellabile.

3.2) Preparazione del gel

3.2.1) Materiali

Di seguito sono riportati i materiali utilizzati per la produzione dei gel.

3.2.1.1) Gelatina di bovino di tipo A/200 bloom

La gelatina è una miscela proteica che si ottiene mediante un processo di denaturazione idrolitica del collagene presente nel tessuto connettivo, risulta solubile in acqua ed è altamente biocompatibile e biodegradabile in un ambiente fisiologico [67]. Sebbene sia un derivato animale il processo di ottenimento conferisce alla gelatina un'antigenicità molto bassa, con la formazione di prodotti metabolici innocui per degradazione. Sono presenti, all'interno della struttura della gelatina alcune sequenze amminoacidiche come la sequenza RGD (o arginil-glicil-aspartica) che, offrendo alle cellule un sito di adesione, migliorano le prestazioni biologiche della gelatina rispetto altri polimeri, (soprattutto quelli sintetici) che non possiedono questo tipo di caratteristiche [68]. Il comportamento di questo polimero è influenzato dalla temperatura, infatti per $T < 32^{\circ}\text{C}$ avrà un comportamento gel mentre per $T > 32^{\circ}\text{C}$ avrà un comportamento sol quindi tenderà a liquefarsi [71]. Infine, grazie alla sua economicità ed elevata disponibilità, la gelatina è ampiamente utilizzata in applicazioni farmaceutiche e mediche ed è stato riconosciuto come materiale GRAS (Generally Regarded As Safe) dalla Food and Drug Administration statunitense [69], per l'utilizzo all'interno dell'esperimento che stiamo analizzando, ha anche l'importante caratteristica di essere un materiale edibile poiché viene ampiamente utilizzato in ambito alimentare. Gli idrogeli di gelatina pura presentano caratteristiche fisiche insoddisfacenti, caratterizzate da un basso modulo elastico, alta isteresi e bassa resistenza a compressione [70]. Sono quindi state studiate alcune strategie per aumentarne le caratteristiche tramite reticolazione, la quale può avvenire tramite utilizzo di gluteraldeide, gruppi metacrilici, bisacrilamide oppure UV, non tutti i metodi sono ottimali per un gel caricato con cellule [71].

3.2.1.2) Alginato

L'alginato è un polisaccaride tipicamente estratto da alghe brune (Phaeophyceae), per trattamento con soluzioni acquose alcaline, solitamente utilizzando NaOH, avente un alto peso molecolare

(tra 32,000 e 400,000 g/mol) [72] e costituito da unità ripetitive di acido β -D-mannuronico e acido α -L-guluronico e che possiede una carica negativa dovuta alla presenza di terminali carbossilici. L'interessante caratteristica di questo polimero è la sua solubilità in acqua e la possibilità di essere reticolato a seguito dell'aggiunta di ioni Ca^{++} in corrispondenza dei blocchi di acido α -L-guluronico.

Questo avviene tramite l'inclusione di ioni calcio all'interno della catena polimerica, tale da formare (Figura 3.1) una struttura "egg-box", all'interno della quale i blocchi di acido guluronato di un polimero formano quindi giunzioni con i blocchi di acido guluronato delle catene polimeriche adiacenti, andando di conseguenza a formare un gel [71].

Il cloruro di calcio (CaCl_2) è uno degli agenti più utilizzati per reticolare ionicamente l'alginato. Tuttavia, esso porta tipicamente a una gelificazione rapida e poco controllata a causa della sua elevata solubilità in soluzioni acquose [72].

Questo materiale permette una scarsa adesione cellulare dovuta al basso numero di siti di attacco, quindi viene solitamente utilizzato assieme ad altri materiali, tuttavia il suo comportamento non viene influenzato dalla temperatura, perciò dopo essere stato reticolato alla temperatura in coltura di 37°C manterrà la sua forma post-stampa, garantendo la shape fidelity.

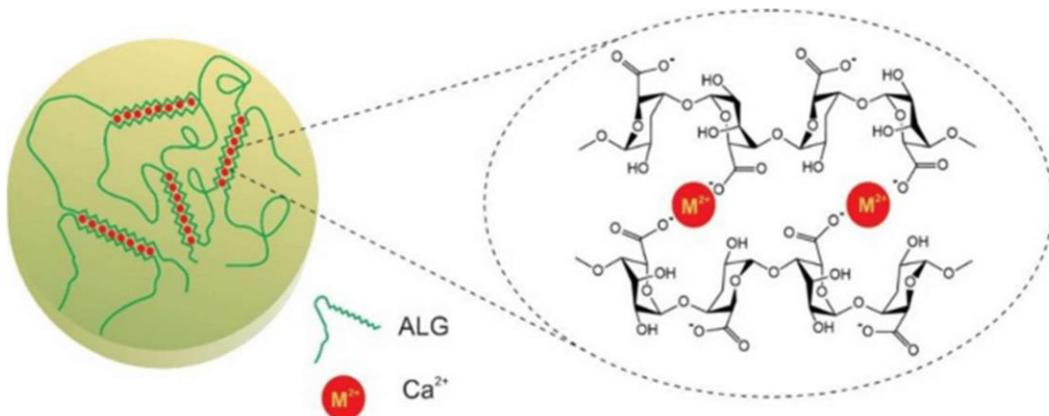


Figura 3.1 Rappresentazione della struttura a egg-box dell'alginato.

3.2.1.3) Mastice di Chios

La gomma di mastice di Chios (CMG) è una resina prodotta dalla pianta *Pistacia lentiscus*, il materiale è insolubile in acqua, ma è tuttavia solubile in diversi solventi organici, tra cui metanolo, dimetilsolfossido (DMSO), acetone e cloroformio [73].

Tra le principali caratteristiche della CMG possiamo riscontrare proprietà antibatteriche [74,75], proprietà antiossidanti [76,77] e antinfiammatorie [78], ha un ampio utilizzo in ambito alimentare essendo adoperata principalmente per la produzione del Dondurma, ovvero il tipico gelato turco. l'utilizzo della CMG per la produzione di tale prodotto fornisce la tipica consistenza elastica e gommosa, contribuendo inoltre a garantire resistenza allo scioglimento anche ad alte temperature climatiche, queste ultime sue proprietà è di particolare interesse in caso di coltura dinamica per la produzione di carne sintetica, poiché l'elasticità che conferisce allo scaffold permetterebbe di simulare al meglio il movimento di trazione e ritorno alla lunghezza di partenza che avviene a livello fisiologico per la formazione di un muscolo, mentre la resistenza allo scioglimento permetterebbe di mantenere il più possibile intatta la struttura dello scaffold durante il periodo all'interno dell'incubatore per una coltura statica o del bioreattore nel caso di una coltura dinamica.

Tutte le varie proprietà citate e il fatto di essere un materiale commestibile hanno suscitato interesse per la sperimentazione del mastice nel campo della produzione della carne ingegnerizzata.

3.2.2) Scelta del gel e valutazione dei vari parametri

3.2.2.1) Gel in gelatina

A seguito delle caratteristiche descritte in precedenza, la gelatina risulta quindi possedere i requisiti necessari per l'utilizzo nel campo del food-engineering, in questa sezione si vuole discutere riguardo al comportamento di gel composti da sola gelatina, infatti proprio questo materiale fornirà le principali caratteristiche meccaniche del gel utilizzato nella prova, ed è stata

valutata la necessità di analizzare la variazione di alcuni parametri a seguito della variazione di % di gelatina all'interno del composto, in particolare sono stati valutati 3 gel contenenti rispettivamente il 7%, 10% e 12% di gelatina disciolta acqua distillata. Il procedimento di preparazione prevede che 5 ml di acqua distillata vengano portati ad una temperatura tra i 45 e i 50°C utilizzando un agitatore magnetico, in modo tale da evitare la degradazione della gelatina a seguito di temperature troppo alte (sopra i 60°C) e allo stesso tempo facilitare lo scioglimento completo della gelatina all'interno del soluto, in seguito viene versata la gelatina bovina e viene lasciata miscelare fino a che la gelatina non sarà completamente disciolta. Viene preparato un campione per ognuno dei tre gel ottenuti inserendoli all'interno di una piastra multi-pozzetto. Si vogliono valutare:

1. In quanto tempo il gel perderà la sua forma, quindi sciogliendosi se posto in un incubatore a temperatura di 37°C.
2. Il tempo di solidificazione del gel posto a temperatura ambiente (circa 26°C) partendo da una sua temperatura iniziale di 40°C.
3. Valutazione della shape fidelity.
4. Valutazione della perdita di peso dopo un certo periodo in incubatore.

Nella valutazione 1 i campioni vengono posti in frigo ad una temperatura di 4°C per 30 minuti, successivamente vengono spostati nell'incubatore, i risultati ottenuti sono mostrati all'interno della Tabella 3.1.

| | | | |
|-------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| Contenuto di gelatina nel gel | 7% | 10% | 12% |
| Tempo (min) | 14 | 30 | 47 |

Tabella 3.1 Tempo di scioglimento del gel in base alla % di gelatina

Dalla prova è emerso che un moderato aumento della % di gelatina nel gel permette di mantenere significativamente per più tempo la forma solida.

Nel punto 2 si vuole studiare la velocità di gelazione dei vari gel, i risultati ottenuti sono riportati in Tabella 3.2.

| | | | |
|----------------------------------|-----------|-----------|----------|
| Contenuto di gelatina nel gel | 7% | 10% | 12% |
| Tempo di gelazione (min) | 23 | 14 | 9 |

Tabella 3.2 Tempo di gelazione del gel in base alla % di gelatina

Per valutare la shape-fidelity, i campioni vengono lasciati in frigo per 30 minuti, in seguito si carica il gel all'interno di una siringa alla quale viene aggiunto un ugello di diametro 0.38 mm, per simulare le medesime dimensioni dell'ugello della stampante che verrà adoperata in seguito. Utilizzando uno stampo in silicone con delle spaziature poste a differenti distanze (1,2,3,4,5 e 6 mm) si estrude un filamento lungo l'asse longitudinale dello stampo.

Del gel composto dal 7% di gelatina si evince che la forma del filamento non viene mantenuta, inoltre non mantiene la compattezza necessaria per attraversare lo stampo (Figura 3.2).

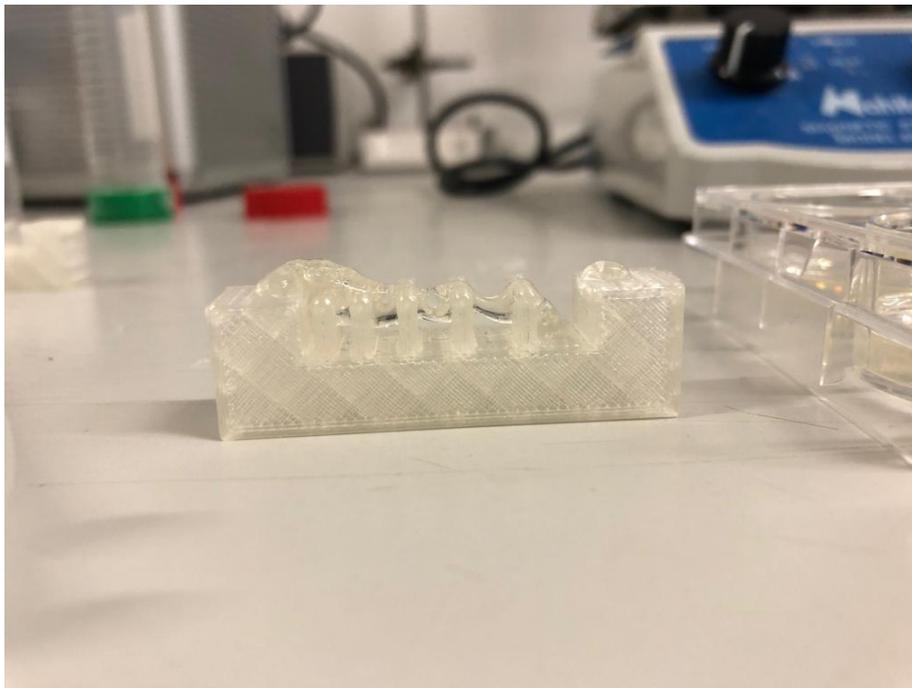


Figura 3.2 Prova per il mantenimento della forma del filamento per gel composto da 7% di gelatina, come è possibile notare il filamento non mantiene una forma ben precisa, anzi tende a sfaldarsi e a cedere anche in prossimità dei gap più piccoli.

Per il gel 10% invece viene mantenuta la forma del filamento e il materiale estruso riesce quasi completamente ad attraversare lo stampo senza una significativa perdita di forma (Figura 3.3). Per l'ultimo gel invece non è stato possibile concludere la prova, poiché il filamento non riusciva ad essere estruso attraverso l'ugello, la sua viscosità era troppo elevata e nonostante i migliori risultati nei due studi precedenti il fatto di non poter essere estruso lo rendeva non adatto al tipo di prova.

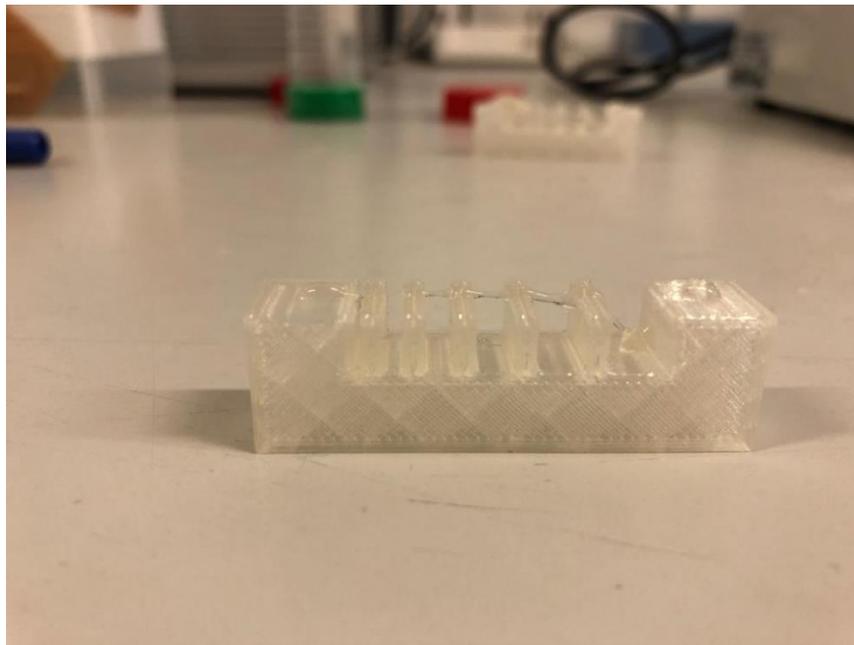


Figura 3.3 Prova per il mantenimento della forma del filamento per gel composto dal 10% di gelatina, come si denota la forma del filamento viene mantenuta quasi del tutto intatta eccetto per il gap finale, nel quale ha ceduto dopo alcuni secondi.

Infine per la valutazione i 4 gel sono stati inseriti in una piastra multipozzetto a 6 pozzetti dal peso di 48g, ogni gel è stato inserito rispettivamente in due pozzetti ciascuno, il peso di del gel in ogni pozzetto era circa 5g, infine il camino della piastra è stato riempito con 12ml di acqua distillata.

Il peso finale risultava essere in totale di 90,21g, il complesso acqua-gel-piastra è stato posto in incubatore per 1 ora, 24 ore e 72 ore (Tabella 3.3).

| | | | |
|-------------|--------------|--------------|--------------|
| Tempo (ore) | 1 | 24 | 72 |
| Peso (g) | 90,03 | 83,67 | 79,78 |

Tabella 3.3 Perdita di peso dei gel a distanza di 1, 24 e 72 ore

3.2.2.2) Gel gelatina-alginato-mastice di Chios

Il gel utilizzato nell'esperimento è composto da 5% di gelatina + 5% alginato e mastice di Chios all'1% (5Ge-5Al-1Ch), l'alginato reticolato tramite cloruro di calcio (CaCl₂) allo 0.25 Mol permetterà allo scaffold di mantenere intatta la sua forma per tutto il periodo di coltura nell'incubatore, permettendo la progressiva sostituzione del gel con le cellule che proliferano. La reticolazione con cloruro di calcio a differenza dell'uso di altre tipologie di reticolanti non porta alla formazione di prodotti tossici durante la degradazione, evitando la morte cellulare e la possibilità di avere un prodotto finale edibile.

I requisiti richiesti del gel sopracitato sono la facilità di ottenimento e la riproducibilità, possedere specifiche proprietà meccaniche e la realizzare di un ambiente che favorisca l'adesione e la proliferazione cellulare, la composizione finale del gel è derivato a seguito di varie prove utilizzando gel con % diverse dei vari composti.

3.2.2.3) Procedura di produzione del gel gelatina-alginato

A seguire sono elencati i vari passaggi eseguiti per produrre il gel 5Ge-5Al-1Ch.

Step 1 Gelatina, alginato e mastice vengono pesati separatamente utilizzando una bilancia di precisione, vengono inoltre preparati due becher graduati contenenti ciascuno metà dell'acqua distillata richiesta per la produzione del gel.

Step 2 Il mastice è idrofobico, utilizzando un pestello i granuli devono essere ridotti in polvere in modo tale da passare attraverso l'ugello della stampante.

- Step 3** All'interno di uno dei due becher precedentemente preparati contenenti acqua distillata viene aggiunto un magnete, si prosegue facendo scaldare il soluto appoggiandolo sulla superficie di un agitatore magnetico.
- Step 4** Tramite l'utilizzo di un termometro viene misurata la temperatura dell'acqua, quando essa raggiunge un range tra i 45 e i 50°C, la manopola della temperatura dell'agitatore magnetico viene spenta e si prosegue aggiungendo la gelatina.
- Step 5** La gelatina viene fatta miscelare per circa 15 minuti, assicurandosi che sia completamente disciolta nell'acqua, viene aggiunta la mastica e lasciato miscelare il tutto per alcuni minuti.
- Step 6** Si versa il contenuto del becher precedentemente preparato all'interno di una siringa evitando la formazione di bolle, infine lo stantuffo viene premuto fino a che il gel non viene spinto fino al bordo della siringa, scuotendo infine la siringa in modo da far uscire l'aria formatasi.
- Step 7** Viene aggiunto un magnete al secondo becher e posto anch'esso sopra il piatto dell'agitatore magnetico, in questo caso viene attivata solo la funzione di miscelazione, poiché a temperature sopra i 37°C l'alginato tende a degradarsi.
- Step 8** Viene versato molto lentamente l'alginato nel becher, evitando il più possibile la formazione di grumi e distribuendo in modo uniforme l'alginato, infine con l'aiuto di una spatola vengono eliminati i piccoli grumi e le bolle d'aria formatosi.
- Step 9** Il contenuto del becher viene travasato in una seconda siringa aiutandosi con una spatola, agire come descritto nello step 6 per l'eliminazione delle bolle d'aria.
- Step 10** L'estremità delle due siringhe vengono unite tramite un luer lock, premendo in modo alternato lo stantuffo delle due siringhe, i due gel vengono miscelati.
- Step 11** Il gel appena ottenuto viene lasciato caricato all'interno della cartuccia di stampa e lasciato per 30 minuti all'interno della stampante a temperatura ambiente all'in modo tale da permettere di raggiungere il punto gelazione della gelatina.

3.3) Scelta delle cellule e semina cellulare

Una volta ottenuto un gel che rispetta i parametri desiderati per la stampa e la permanenza in incubatore, si ritiene necessario scegliere il tipo di cellule da utilizzare. Le cellule scelte saranno

caricate all'interno del gel per poi essere stampate al fine di ottenere uno scaffold che contenga già le cellule al suo interno. Come descritto in precedenza per ottenere della carne ingegnerizzata è necessario utilizzare cellule staminali adipose e cellule satellite, tuttavia dal momento che in questo progetto si stanno valutando le fasi iniziali per un processo innovativo volto alla produzione di carne sintetica, la scelta è stata fatta verso fibroblasti L929 provenienti da tessuto adiposo di topo e coltivati nel mezzo di coltura Dulbecco 's Modified Eagle Medium (DMEM, D5796, Sigma- Aldrich) a cui è stato aggiunto 10% siero fetale bovino (FBS), 1% L-Glutamina (L-Glut) e 1% penicillina streptomycina. Questa tipologia di cellule risulta essere più semplice da gestire in una coltura rispetto alle satellite e alle staminali adipose, è ampiamente studiata perciò le caratteristiche sono note e vi è una vasta disponibilità. L'utilizzo di questa linea cellulare permetterà di valutare se la scelta del gel, del metodo di coltura e della strategia di stampa risultano essere adeguati per raggiungere gli obiettivi della prova.

3.3.1) Fasi per la preparazione della semina cellulare

I passaggi vengono all'interno di cappa a flusso laminare, i valori utilizzati sono relativi all'utilizzo di flask con aree di coltura di 25cm^2 .

Step 1 Una Falcon contenente 5 ml di mezzo di coltura viene messa in un bagnetto termostato 37° .

Step 2 Il mezzo esausto all'interno della flask contenente le cellule viene rimosso utilizzando una pipetta.

Step 3 Vengono eseguiti 2 lavaggi in PBS da 2 ml.

Step 4 Una volta rimosso il PBS, sono stati aggiunti 0,5-1 ml di soluzione di tripsina 1x.

Step 5 La flask contenente tripsina è stata posta in incubatore a 37°C con pressione parziale della Co_2 al 5% per 5 minuti.

Step 6 Viene preparata una seconda flask contenente 3ml di medium fresco.

Step 7 La flask contenente la tripsina viene estratta dall'incubatore e utilizzando un microscopio ottico invertito viene verificato il completo distacco dei fibroblasti.

Step 8 Vengono aggiunti 3ml di mezzo di coltura contenente calcio e magnesio per inibire l'azione della tripsina.

Step 9 La sospensione viene inseguito spostata in una Falcon sterile e centrifugata per 5 min a 1200 giri al minuto per ottenere il pellet di cellule.

Step 10 Il surnatante composto da mezzo + tripsina è stato rimosso e le cellule risospese in 2 ml di medium fresco.

Step 11 Le cellule vengono spostate nella flask preparata nello step 6, in totale saranno presenti 5ml di mezzo e devono essere sufficienti a ricoprire completamente la superficie di coltura della flask.

3.4) Sterilizzazione delle polveri

In considerazione del fatto che il gel che viene adoperato per la produzione dello scaffold sarà caricato con i fibroblasti, si ritiene necessario fornire alle cellule un ambiente il più sterile possibile in modo tale proliferare senza la presenza di contaminazioni. Per sterilizzare gelatina e alginato viene utilizzata la sterilizzazione tramite etanolo, mentre per il mastice di Chios, la polvere precedentemente ottenuta verrà lasciata all'interno di una cappa a flusso laminare verticale classe 10 "Two 30" per un ora e sterilizzata tramite raggi UV con potenza 200 Watt.

Fasi per la sterilizzazione gelatina e alginato:

Step 1 Viene aggiunta la quantità di alginato o gelatina desiderata in un becher e si prosegue riempiendo con etanolo puro fino a coprire completamente la polvere. Successivamente, viene inserito un magnete e utilizzando uno stirrer il composto viene agitato.

Step 2 Lo stirrer e la quantità di etanolo vengono regolati affinché tutta la polvere venga agitata in modo corretto, il tutto viene agitato per 15 minuti.

Step 3 Con l'aiuto di un pipettatore, viene prelevato il maggior quantitativo possibile di etanolo facendo attenzione a non toccare né la punta del pipettatore, né il magnete, né l'alginato.

Step 4 Ripetere i vari passaggi e agitare per 15 minuti;

Step 5 Al termine dei 15 minuti, lavorare sotto cappa a flusso laminare e si prosegue con l'eliminazione della maggior parte quantità di etanolo possibile.

Step 6 Il tutto viene ripetuto agitando per altri 15 minuti. Dopodiché, senza spegnere l'agitatore, rovesciare la sospensione all'interno di una piastra di Petri.

Step7 L'etanolo viene fatto completamente evaporare, successivamente si parafilma.

3.5) Creazione del G-code

In questo capitolo verranno presentati i processi che precedono la fase di stampa, in particolare ci si focalizzerà sui software utilizzati e sul loro set-up.

Una qualsiasi stampante 3D necessita di istruzioni univoche per poter procedere con la stampa dell'oggetto desiderato, queste istruzioni sono chiamate G-code, ovvero un codice che fornisce tutti quei comandi che dicono alla nostra stampante come e quando azionare i motori, a che velocità muoversi, quanto materiale estrarre, ecc.

Per generare un file in formato G-code occorre come primo punto creare un oggetto 3D tramite un programma di modellazione CAD e salvare quest'ultimo come file .STL, il punto successivo prevede l'utilizzo di un secondo software per passare da questo formato al formato G-code che sarà il linguaggio macchina che permetterà di generare le istruzioni necessarie per una stampa ottimale.

Nel caso concreto sono stati utilizzati 3 software:

1. **Fusion 360**, programma utilizzato per creare l'oggetto 3D e per ottenere il file .STL, si tratta di un software CAD sviluppato da Autodesk nel 2013.
2. **PrusaSlicer**, utilizzato per convertire il formato .STL in formato G-code, con questo software vengono settati tutti i parametri per ottenere una stampa ottimale anche in funzione del tipo di stampante utilizzato, in particolare è possibile scegliere varie impostazioni di stampa come l'altezza del layer, il tipo di riempimento e aggiungere brim e skirt oppure regolare le impostazioni del filamento.
3. **Spyder**, è un ambiente di sviluppo integrato (IDE) multiplatforma open source per la programmazione scientifica in linguaggio Python, creato e sviluppato da Pierre Raybaut nel 2009. Nel caso in esame un file python denominato postprocessing è stato utilizzato per rendere il G-code ottenuto tramite PrusaSlicer compatibile con la stampante, la quale si tratta di Inkredible + prodotta da Cellink AB, senza questo passaggio i processori della stampante non si accenderebbero e non si avrebbe l'estrusione dell'oggetto.

3.5.1) Il disegno 3D

La scelta della geometria 3D che si vuole stampare è fondamentale sia per la scelta dei parametri di stampa e sia per la buona riuscita dell'esperimento. Attraverso l'utilizzo di fusion 360 sono state create due geometrie, per la prima si è pensato ad un volume di prova dato da una serpentina di lunghezza 2,3 mm e altezza 0,41 mm (Figura 3.5), ovvero la misura del diametro dell'ugello che sarà impiegato, questa struttura ha avuto la funzione di verificare la stampabilità e la shape-fidelity dei vari gel provati nel corso dell'esperimento.



Figura 3.4 Serpentina

La seconda geometria rappresenta la forma dello scaffold, è costituita da 10 strati di altezza 0,41mm ciascuno, il singolo strato rappresenta un diametro circolare di 2,3 mm in cui sono poste

delle sbarre da 0,41 mm di spessore, ogni strato è ruotato di 90° rispetto a quello precedente in modo tale che il risultato finale sia una sorta di piccolo hamburger con la facciata superiore a griglia (Figura 3.6).

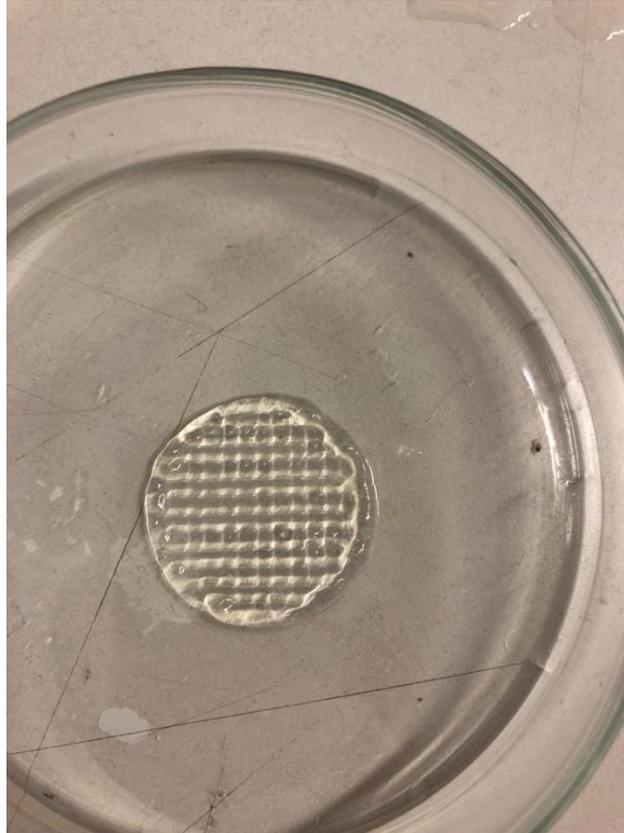


Figura 3.5 Struttura finale dello scaffold

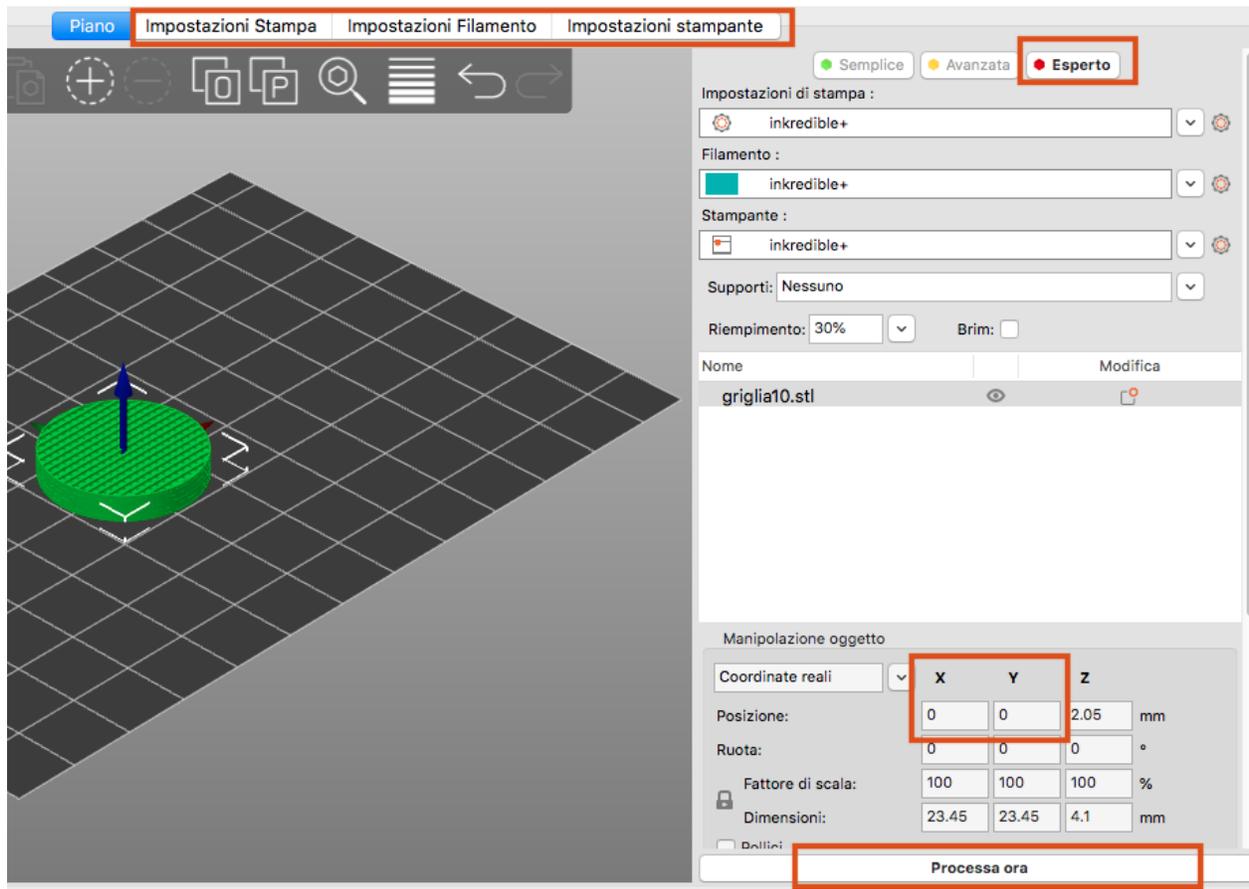
I passaggi in breve per la realizzazione della geometria ad hamburger sono:

- Sul piano Z vengono rappresentati 2 cerchi, uno esterno di diametro 2,3mm e uno interno con raggio inferiore al precedente di 0,41mm.
- Lo spazio tra i due cerchi viene estruso tramite il comando “Estrusione” di 0,41mm al fine di ottenere una forma cilindrica cava.
- Al centro del cerchio esterno si disegna un rettangolo di spessore 0,41mm e lunghezza sufficiente a coprire l'intero diametro.
- Il rettangolo viene estruso.

- Tramite il comando “Crea serie” vengono prodotte copie del rettangolo fino a coprire l’intera superficie del cerchio.
- Tramite il comando “Estrusione” si crea un’estrusione negativa per eliminare tutto ciò che si trova all’esterno del cerchio.
- Viene creata una copia del solido ottenuto utilizzando nuovamente il comando “Crea serie”.
- Tramite l’apposito comando “Sposta” si ruota di 90° il secondo solido rispetto al primo, lo si sposta sull’asse Z finché le due superfici non aderiscono completamente, imposto la nuova figura come un solido unico.
- Utilizzando un’ultima volta il comando “Crea serie” duplico la griglia per 5 volte, infine faccio aderire i vari strati l’uno sull’altro spostandoli sull’asse Z.
- Il file viene salvato come “.Stl” .

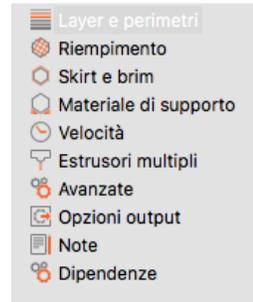
3.5.2) Il G-code

In questa parte del capitolo 3 verranno mostrate le schermate relative all'inserimento dei parametri di stampa in PlusaSlicer.



In alto nella zona centrale sono presenti le impostazioni per la stampa, per il filamento e per la stampante. In alto a destra è stato scelto è stato impostato “Esperto” in modo da avere maggiore scelta nei parametri. In basso a destra nella manipolazione oggetto va verificato che le coordinate X e Y siano a 0 in modo che la stampa avvenga al centro. Sempre in basso a destra il pulsante processare ora permette di ottenere il file G-code.

In “impostazioni stampa” si trovano le seguenti opzioni:



A seguire sono mostrati i parametri inseriti per ogni sezione, la prima è “layer e perimetri”



“Riempimento”



La densità di riempimento è denominata anche infill e costituisce il riempimento interno della stampa 3D, una percentuale più alta di infill porta ad una resistenza meccanica maggiore mentre una sua riduzione comporta come vantaggio il risparmio di materiale e di conseguenza anche di avere layer tempi di stampa minori. Con l’aumentare del riempimento non si ha una maggiorazione delle caratteristiche meccaniche in modo proporzionale, infatti oltre il 50% si avrebbe solo un maggior dispendio di materiale con scarsi aumenti di resistenza. Nell’ambito di stampa di uno scaffold la densità di riempimento porterà alla formazione di porosità, le quali sono necessaria

alla proliferazione cellulare, vogliamo una porosità alta (almeno del 90%) e dimensioni dei porosi da garantire una buona viabilità cellulare. Come mostrato nell'immagine in alto si è optato per un infill del 30% essendo un buon compromesso tra porosità e resistenza, ricordando che lo scaffold dovrà svolgere la sua funzione meccanica fino a quando le cellule non saranno di numero tale da costituire esse stesse l'impalcatura del tessuto, sostituendosi alla funzione di sostegno data dallo scaffold.

Un ultimo punto importante è il fattore tempo, dal momento che si lavora con un gel carico di fibroblasti, minore è il tempo in cui le cellule vengono mantenute al di fuori dall'incubatore e minore sarà la sofferenza cellulare la quale porterebbe alla morte di una parte di esse. Per questo motivo un infill del 30% garantisce anche vantaggi sul fattore delle tempistiche di stampa.

“Velocità”

The image shows a screenshot of a 3D printing software interface with the following settings:

| Velocità per i movimenti di stampa | | |
|------------------------------------|------|----------|
| Perimetri: | 8 | mm/s |
| Perimetri piccoli: | 8 | mm/s o % |
| Perimetri esterni: | 100% | mm/s o % |
| Riempimento: | 6 | mm/s |
| Riempimento solido: | 20 | mm/s o % |
| Riempimento solido superiore: | 15 | mm/s o % |
| Materiale di supporto: | 60 | mm/s |
| Interfaccia materiale di supporto: | 100% | mm/s o % |
| Bridge: | 8 | mm/s |
| Riempimento spazi: | 0 | mm/s |
| Stiratura: | 15 | mm/s |

| Velocità per i movimenti non di stampa | | |
|--|----|------|
| Spostamento: | 80 | mm/s |

| Modificatori | | |
|---------------------------|------|----------|
| Velocità del primo layer: | 100% | mm/s o % |

“Avanzate”

| Larghezza estrusione | | |
|-----------------------------------|--|--------|
| Larghezza estrusione predefinita: | <input type="lock"/> <input type="text" value="0"/> | mm o % |
| Primo layer: | <input type="unlock"/> <input type="text" value="100%"/> | mm o % |
| Perimetri: | <input type="lock"/> <input type="text" value="0"/> | mm o % |
| Perimetri esterni: | <input type="lock"/> <input type="text" value="0"/> | mm o % |
| Riempimento: | <input type="lock"/> <input type="text" value="0"/> | mm o % |
| Riempimento solido: | <input type="lock"/> <input type="text" value="0"/> | mm o % |
| Riempimento solido superiore: | <input type="lock"/> <input type="text" value="0"/> | mm o % |
| Materiale di supporto: | <input type="lock"/> <input type="text" value="0"/> | mm o % |

| Sovrapposizione | | |
|--|---|--------|
| Sovrapposizione riempimento/perimetri: | <input type="unlock"/> <input type="text" value="50%"/> | mm o % |

| Flusso | | |
|-------------------------|---|--|
| Rapporto flusso Bridge: | <input type="lock"/> <input type="text" value="1"/> | |

| Slicing | | |
|---------------------------------|---|----|
| Gap closing radius per slicing: | <input type="lock"/> <input type="text" value="0.049"/> | mm |
| Risoluzione: | <input type="lock"/> <input type="text" value="0"/> | mm |
| Compensazione dimensione XY: | <input type="lock"/> <input type="text" value="0"/> | mm |
| Compensazione zampa d'elefante: | <input type="lock"/> <input type="text" value="0.2"/> | mm |

In “impostazioni filamento” si trovano le seguenti opzioni :

- Filamento
- Raffreddamento
- Avanzate
- Sovrascrittura filamento
- G-code personalizzato
- Note
- Dipendenze

“G-code personalizzato”

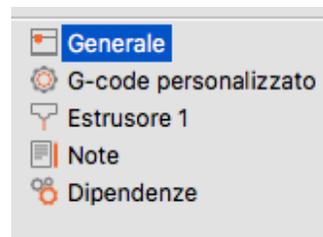
```
; Filament gcode
```

G-code finale

 •

```
; Filament-specific end gcode  
;END gcode for filament
```

In “impostazioni stampante” si trovano le seguenti opzioni :



“G-code personalizzato”

 •

```
G0 Z50  
M84 ;disable motors  
;END
```

“Estrusore 1”

Dimensioni

● Diametro ugello: mm

Limiti altezza layer

● Minimo: mm

● Massimo: mm

Posizione (per stampanti multi-estrusore)

● Offset estrusore: x: y: mm

Posizione (per stampanti multi-estrusore)

● Offset estrusore: x: y: mm

Retrazione

● Lunghezza: mm (imposta a zero per disabilitare)

● Solleva Z: mm

● Solleva Z solamente: Z Sopra: mm Z Sotto: mm

● Velocità di retrazione: mm/s

● Velocità di deretrazione: mm/s

● Lunghezza extra in ripresa: mm

● Spostamento minimo dopo una retrazione: mm

● Retrai al cambio layer:

● Pulisci durante la retrazione:

● Retrai la quantità prima di pulire: %

Retrazione quando l'attrezzo è disabilitato (impostazioni avanzate per setup multi-estrusore)

● Lunghezza: mm (imposta a zero per disabilitare)

● Lunghezza extra in ripresa: mm

Anteprima

● Colore estrusore:

3.5.3) Attivazione dei processori della stampante

Una volta aver premuto il tasto processa, si otterrà il G-code; tuttavia, come precedentemente spiegato questo non sarà subito compatibile con la stampante, ma richiederà un ulteriore processo da effettuare tramite il software Spyder.

Tramite Spyder viene aperto un file python contenente le istruzioni necessarie nominato postprocessing.py, nella parte finale del codice è presente:

```

def processFile():
    global outbuffer
    inFile = open(inFileName, 'r')
    for line in inFile:
        processLine(line)
    #Add the following lines at the end of the print file.
    inFile.close()

```

Sarà sufficiente aggiungere sotto la linea di codice “*global outbuffer*” il comando

```
inFileName = “nome del file.gcode”
```

Una volta eseguito il codice, il G-code nominato verrà modificato e sarà quindi compatibile con la stampante Inkredible +, è possibile verificare la corretta modifica aprendo il G-code con blocco note e controllando che in alto sia riportato la dicitura “*postprocessed*”.

3.6) Processo di stampa

Per il processo di stampa è stata utilizzata la stampante 3D Inkredible + (Figura 3.7), si tratta di una biostampante pneumatica a estrusione con doppie testine di stampa e sistema di polimerizzazione a LED UV per la biostampa di complessi modelli di tessuti umani e organi per la ricerca sull'ingegneria dei tessuti. Il processo di bioprinting funziona attraverso l'estrusione di un biomateriale bioinchiostro o idrogel combinato con cellule umane partendo dalla base e proseguendo in altezza, strato per strato fino a quando non viene costruito un oggetto 3D. Questo tipo di stampante ha due estrusori, ma per il tipo di stampa è stato sufficiente utilizzarne solo uno.



Figura 3.6 Stampante Inkredible +

3.6.1) Fasi della stampa

In seguito, sono riportati i passaggi che comprendono il caricamento del bioinchiostro e le fasi per reticolare correttamente lo scaffold.

Step 1 Il G-code viene caricato nella scheda SD della stampante.

Step 2 Viene preparato il cloruro di calcio necessario per la reticolazione del bioinchiostro.

Step 3 Il gel precedentemente tenuto in frigo viene inserito all'interno di una siringa.

Step 4 Utilizzando un luer lock, dalla siringa il gel viene caricato all'interno della cartuccia della stampante, è importante caricare una quantità non superiore ai 3,5 ml.

Step 5 Alla cartuccia viene inserito un ugello con diametro di uscita di 0,41 mm, infine si prosegue

inserendo la cartuccia nell'apposito spazio e serrando a vite.

Step 6 Vengono eseguiti i vari passaggi esplicitati nella sezione **3.6.2**.

Step 7 Durante il processo di stampa, utilizzando una pipetta Pasteur, viene aggiunto nella parte esterna del costrutto alcune gocce di CaCl₂, in modo tale da garantire il sostegno della struttura evitando dei collassi.

Step 8 Si conclude la stampa aggiungendo del reticolante anche sulle parti del costrutto non ancora reticolate.

Step 9 Dopo aver fatto reagire il reticolante per un minuto, la CaCl₂ non reagita viene eliminata.

3.6.2) Set up di Incredible +

Verranno ora elencate le varie fasi per calibrare nel modo consueto la stampante prima dell'inizio del processo di stampa, i passaggi dal 4 al 9 vanno ripetuti ogni volta che viene stampato un oggetto in quanto il setting non viene mantenuto in memoria.

Step 1 Accensione del compressore.

Step 2 Accensione della stampante.

Step 3 Verificare che il piano di stampa sia sgombro da oggetti.

Step 4 Verificare che la pressione sia 0, altrimenti sistemarla utilizzando la manopola laterale.

Step 5 Si procede con la calibrazione degli assi, dal display premere "Prepare Bioprint" a seguire

"Home Axes".

Step 6 Posizionare la piastra di Petri .

Step 7 Per calibrare la Z cliccare sempre su "Prepare Bioprint" → "Move Z", utilizzando la manopola di fianco al display, muovere la cartuccia fino a quasi a toccare la Petri ma comunque, evitando il contatto con essa, si termina l'azione premendo "Calibrate Z".

Step 8 Per settare la pressione premere "Prepare Bioprint" → "Turn ON PH1", utilizzando la valvola a destra della stampante regolare la pressione, con l'aumento della pressione il

filamento del gel inizierà ad essere estruso, la pressione verrà regolata finché l'uscita della fibra estrusa e il filamento non saranno regolari. Terminare premendo "Turn OFF PH1".

Step 9 Settare la temperatura della stampante a 26° se impostata ad una temperatura differente.

Step 10 Per iniziare il processo di stampa dal comando "Bioprint" si seleziona il file G-code d'interesse.

Step 11 Terminato il processo di stampa, si riporta a 0 la pressione tramite l'apposita manopola.

Step 12 Spegner la stampante.

Step 13 Spegner il processore.

Capitolo 4: Risultati

4.1) Valutazioni durante la fase pre-stampa

Nel capitolo del 3.2 è stato valutato il comportamento di gel contenenti solo gelatina in modo tale da studiare tale materiale al fine di utilizzarlo all'interno di un gel più complesso.

E' stato inoltre descritto il gel finale utilizzato durante il processo di stampa ovvero 5% Gelatina-5% Alginato-1% Mastice di Chios, tuttavia prima dell'utilizzo di tale composizione sono state effettuate diverse prove con % diverse di Gelatina-Alginato e di reticolante (CaCl₂).

In questa sezione verranno presentati i risultati ottenuti dalle diverse prove effettuate e verranno descritte le loro criticità.

in Tabella 4.1 sono elencati i tipi di gel testati e il motivo per cui il loro utilizzo è stato escluso, questi gel sono stati studiati nella fase prima della stampa, quindi sono stati estrusi tramite siringa all'interno di una piastra multi pozzetto cercando di dare una forma a spirare al filamento depositato e successivamente sono stati reticolati, infatti il punto principale di questa fase è valutare la quantità di alginato da utilizzare e la % di reticolante utile a permettere il corretto mantenimento della forma. I composti studiati sono stati lasciati inizialmente in frigorifero a 4°C per 10 minuti in modo tale da lasciare il tempo al gel di reticolare e in seguito posti in incubatore a temperatura 37°C e CO₂ 5% per 24 ore.

| Composizione del gel | Problemi riscontrati |
|---|---|
| 6% Gelatina 2% Alginato reticolato con CaCl ₂ 0,25 Mol | Il gel non reticolato mantenuto 30 minuti a temperatura ambiente risultava troppo liquido. Il gel reticolato presentava una % di Alginato reticolato non sufficiente a garantire il mantenimento della struttura dello scaffold nell'incubatore, la struttura estrusa tendeva quindi a perdere la sua forma. (Figura 4.1) |
| 2% Gelatina 6% alginato reticolato con CaCl ₂ 0,25 Mol | Come per il gel precedente il gel non reticolato tendeva a liquefarsi e ad non mantenere la forma datagli. Per la maggior % di alginato presente e che quindi ha reticolato il gel mantiene la forma in modo migliore rispetto alla composizione precedente tuttavia non raggiunge ancora il risultato desiderato, difatti la forma a spirale non è stata comunque mantenuta. (Figura 4.1) |
| 4% Gelatina 4% Alginato reticolato con CaCl ₂ 0,5 Mol | Il gel presentava delle crepe sulla superficie a causa dell'eccessivo grado di reticolazione dell'alginato. |

Tabella 4.1 Gel testati nella fase pre-stampa e motivi del loro fallimento.

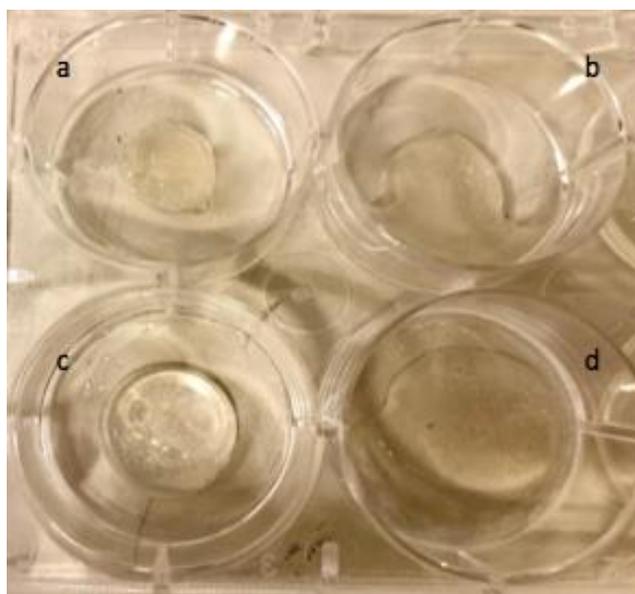


Figura 4.1 l'immagine b e d mostrano rispettivamente il gel 2Gel-6Alg e 6Gel-2Alg non reticolati, si evince come nessuno dei due inchiostri abbia mantenuto la forma a spirale poiché

risultavano troppo liquidi. Mentre le immagini a e c mostrano rispettivamente il gel 2Gel-6Alg e 6Gel-2Alg reticolati, si nota che il primo del ha mantenuto una forma circolare nonostante la permanenza in incubatore, mentre il secondo gel non ha mantenuto il diametro iniziale.

Gel contenenti 6% Gelatina + 6% Alginato e 4% Gelatina + 4% Alginato reticolati tramite CaCl_2 0,25 Mol hanno mostrato risultati soddisfacenti per quanto riguarda il mantenimento della forma e quindi sono stati testati nella fase successiva.

4.2) Valutazione durante la fase di stampa

La fase di stampa è quella che ha fatto emergere la quantità maggiore di problematiche, infatti bisogna rispettare vari vincoli per poter stampare in modo soddisfacente con un gel carico di cellule:

- Estrudibilità, evitando la formazione di goccioline o filamenti all'uscita dell'ugello per pressione di estrusione.
- Filamento estruso in modo continuo evitando irregolarità.
- Pressioni basse al fine di garantire la maggiore vitalità cellulare possibile (30-80 kPa).
- Mantenimento della forma finale per evitare il collasso del costruito.
- Riproducibilità del costruito.

La prima problematica emersa durante la stampa era dovuta proprio all'estrudibilità del gel, in quanto il Mastice di Chios non essendo solubile in soluzione acquosa tendeva ad aggregarsi ed ad otturare l'ugello, per ovviare a tale inconveniente è stato pensato di ridurre i granuli di mastice in polvere tramite l'utilizzo di un pestello, esso viene in seguito aggiunto poco per volta nel medesimo becher in cui è presente la gelatina mentre il miscelatore è in funzione, in questo modo la mastica rimarrà distribuita uniformemente all'interno della soluzione evitando che in fase di stampa vengano a formarsi aggregati. Una seconda soluzione avrebbe previsto l'uso di un ugello con diametro maggiore, tuttavia questo avrebbe impattato sulla qualità della stampa.

Il primo gel utilizzato come inchiostro per le prove di stampa aveva come composizione 4% Gelatina + 4% Alginato + 1% Mastice di Chios, per le prove effettuate con questa tipologia, l'inchiostro è stato inizialmente lasciato per 10 minuti in frigorifero in modo che la gelatina raggiungesse il suo gel-point e successivamente lasciato per 5 minuti a temperatura ambiente in modo da renderlo meno viscoso durante la fase di stampa. Il risultato è mostrato in figura 4.2 e 4.3.

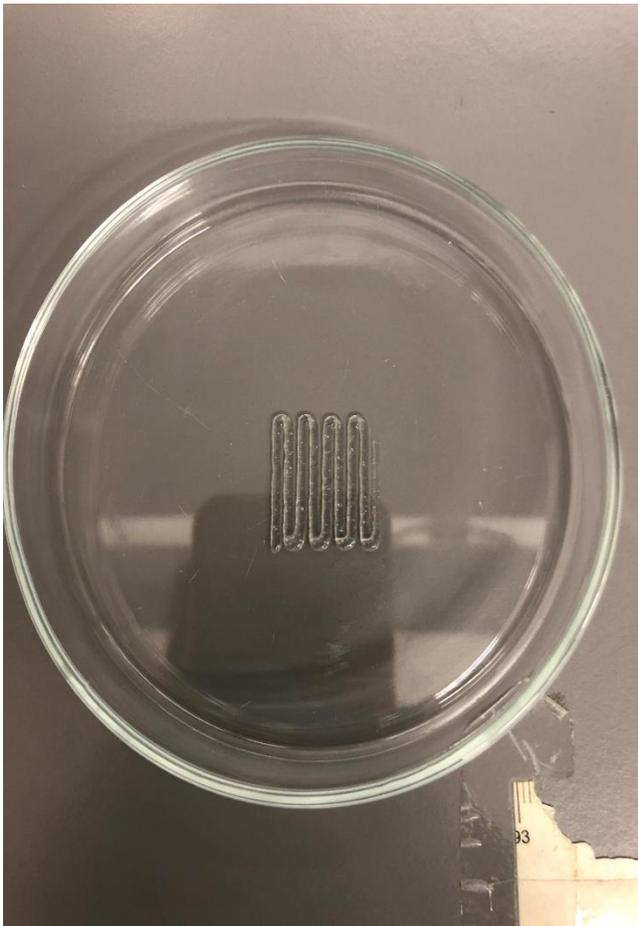
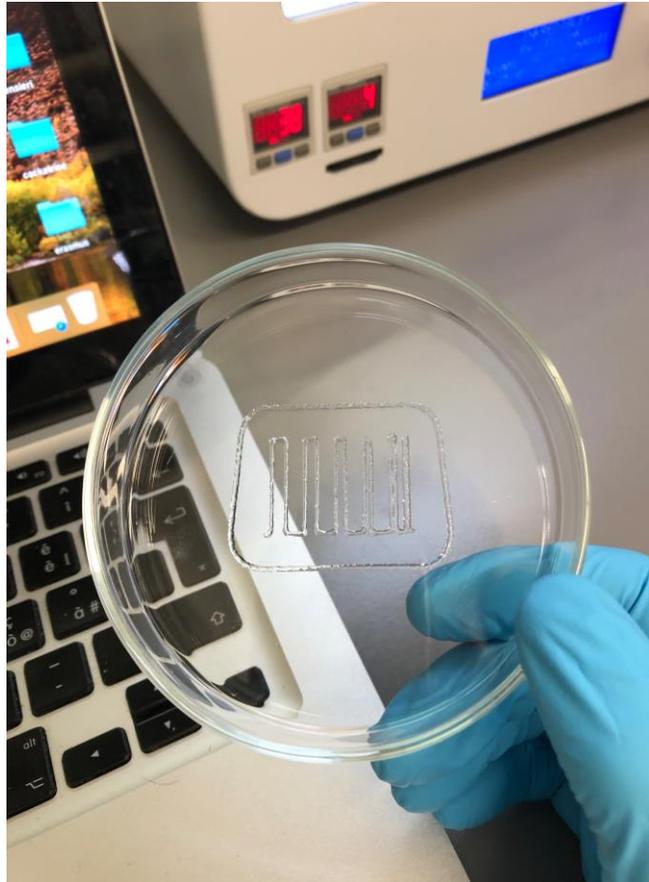


Figura 4.2 Serpentina ad anse regolari stampata con temperatura di stampa impostata a 26°C e pressione di 70 Kpa.

Figura 4.3 Serpentina con anse di dimensioni variabili stampata con temperatura di stampa impostata a 26°C e pressione di 70 Kpa



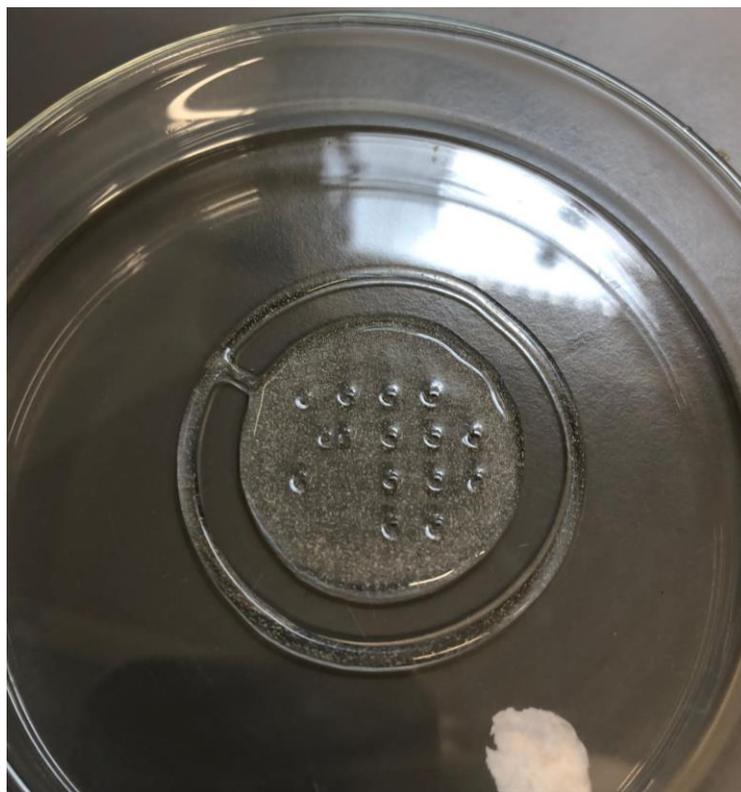
Nonostante i risultati mostrino una stampa soddisfacente, non era stato considerato il fatto che riporre la cartuccia all'interno del frigorifero avrebbe impattato sulla sterilità del gel, questo avrebbe portato ad eventuali problematiche di contaminazione qual'ora all'interno dell'inchiostro fossero state presenti delle cellule.

Per ovviare a tale problematica si è pensato di provare a stampare il gel lasciandolo all'interno della stampante per 30 minuti. Tenendo in considerazione che per garantire una buona vitalità cellulare sarebbe consigliabile che le cellule non rimangano fuori dall'incubatore per un tempo maggiore di 50-60 minuti e che intercorre del tempo tra il caricamento del gel con le cellule, la stampa e la reticolazione tramite cloruro di calcio, 30 minuti è il tempo limite per garantire la minor sofferenza cellulare durante tutto il processo.

La stampa del medesimo gel ma a temperatura ambiente ha portato ad una resa non

soddisfacente, in particolare la stampa avveniva a pressioni basse rispetto alle prove precedenti con l'inchiostro lasciato a 4° ovvero nell'ordine dei 28-30 kPA, in particolare nonostante queste pressioni vadano bene per la vitalità cellulare, il filamento era troppo liquido e non manteneva la forma, per questo il suo utilizzo è stato ritenuto non idoneo per la stampa di strutture maggiormente complesse. Il risultato è mostrato nella figura 4.4.

Figura 4.4 Fase di stampa del gel 4% gelatina 4% alginato, come mostrato nell'immagine la forma della griglia non viene mantenuta in modo ottimale, questo risultato si rivelerebbe più incisivo in caso di scaffold più complessi e a più strati come quello richiesto in questo esperimento.



Prove successive sono state fatte effettuando stampe di gel con % maggiori di gelatina e/o alginato, tenendo in considerazione che quantità maggiori al 6% di alginato possono risultare tossici per le cellule, è stato inoltre diminuito l'infill, passando dal 30% al 25% in modo tale da avere una maggiore spaziatura tra il deposito dei vari filamenti nella griglia, evitando che essendo troppo vicini, una leggera perdita di forma del filamento abbia come conseguenza che non vi sia più possibilità di distinguere lo spazio che intercorre tra le varie fibre.

La diminuzione dell'infill deve comunque garantire lo sviluppo dello scaffold in altezza per tutto il processo di stampa, in seguito alle varie stampe non è stato evidenziato un peggioramento tra le stampe ad infill 30% e quelle ad infill 25%.

Viene anche considerato che la quantità di alginato non può essere diminuita in quanto è proprio questo materiale che reticolerà tramite CaCl_2 e costituirà l' "ossatura" dello scaffold che contiene un'alta % di gelatina che però non è reticolata.

In particolare sono stati stampati i seguenti inchiostri:

1. 6% Gelatina + 6% Alginato + 1% Mastice di Chios
2. 5% Gelatina + 5% Alginato + 1% Mastice di Chios
3. 7% Gelatina + 5% Alginato + 1% Mastice di Chios
4. 4% Gelatina + 5% Alginato + 1% Mastice di Chios

I gel 1 e 3 avevano una gelazione rapida, dopo solo 10 minuti collocati all'interno dell stampante con temperatura impostata a 26°C la gelatina aveva già raggiunto il gel-point, la qualità della stampa era ottimale tuttavia le pressioni di stampa erano decisamente troppo elevate, intorno al range di 115-130 Kpa. In figura 4.5 e 4.6 sono mostrati i risultati rispettivamente il gel 1 con una griglia a 6 strati e il gel 3 con una griglia a 2 strati.

Il gel 4 risultava leggermente migliore del 4% Gelatina + 4% Alginato, tuttavia risultava ancora troppo liquido anche lasciandolo 30 minuti all'interno della stampante e non permetteva di ottenere una scaffold che potesse svilupparsi in modo soddisfacente in altezza.

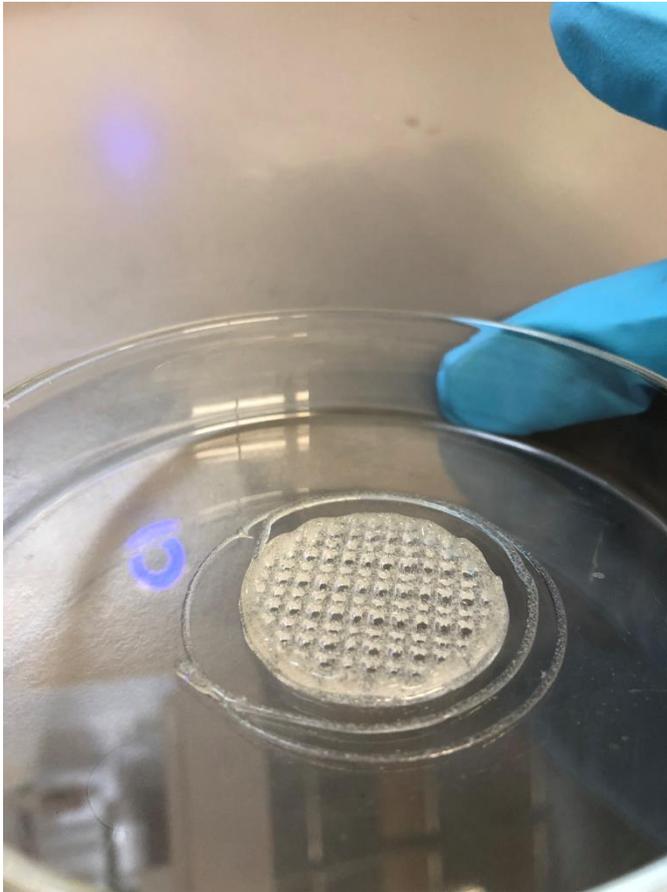


Figura 4.5 E' possibile notare come la qualità della stampa sia ottimale, le varie fibre mantengono intatta la forma permettendo di distinguere i fori della griglia, inoltre la struttura di sviluppa in altezza senza cedimenti strutturali.



Figura 4.6 Anche in questa immagine è possibile evidenziare una buona qualità della stampa

La soluzione migliore è risultata essere il gel 2 seppur con vari difetti, infatti il risultato della stampa risulta variare leggermente da stampa a stampa, questo è soprattutto da attribuire alla temperatura del laboratorio che non è fissa, in figura 4.7 viene mostrata la stampa di una griglia a due strati reticolata da cloruro di calcio. In parte questa problematica come negli altri gel è stata risolta ponendo la cartuccia nella stampante con temperatura fissa di 25°C/26°C, poiché la temperatura all'interno del laboratorio non essendo controllata influisce sulla viscosità del gel e sul tempo di raggiungimento del gel-point.



Figura 4.7 Risultato della stampa e reticolazione di una griglia a 2 strati del gel 5% Gelatina + 5% Alginato + 1% Mastice di Chios

Con l'inchiostro 5% Gelatina + 5% Alginato + 1% Mastice di Chios è stato possibile trovare un compromesso per soddisfare tutti i requisiti richiesti:

- Pressione di stampa assestata all'interno di un range di 39-49 Kpa.

- Qualità di stampa buona anche se varia leggermente da prova in prova (Figura 4.8).
- Mantenimento della struttura in altezza (Figura 4.9 e Figura 4.10).
- La quantità dei materiali usati non altera la vitalità cellulare.
- I tempi tra il caricamento delle cellule e il completamento della stampa sono in linea con quanto previsto nei requisiti.

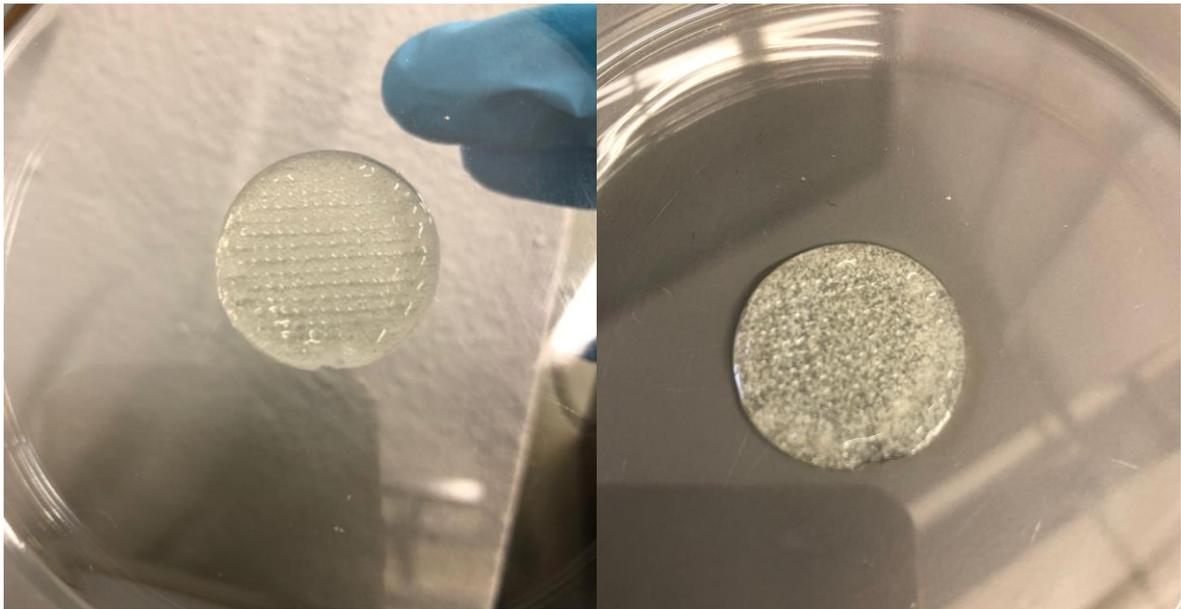


Figura 4.8 Dall'immagine è possibile notare una differenza sul risultato finale, in particolare a sinistra viene mostrato uno scaffold stampato a 21°C, mentre a destra uno scaffold stampato a 26°C, a temperature minori la risoluzione di stampa risulta essere maggiore a scapito di pressioni più alte rispetto a stampe a temperature maggiori, in entrambi i casi mostrati la struttura viene comunque mantenuta perfettamente in altezza e a pressioni compatibili con la prova.

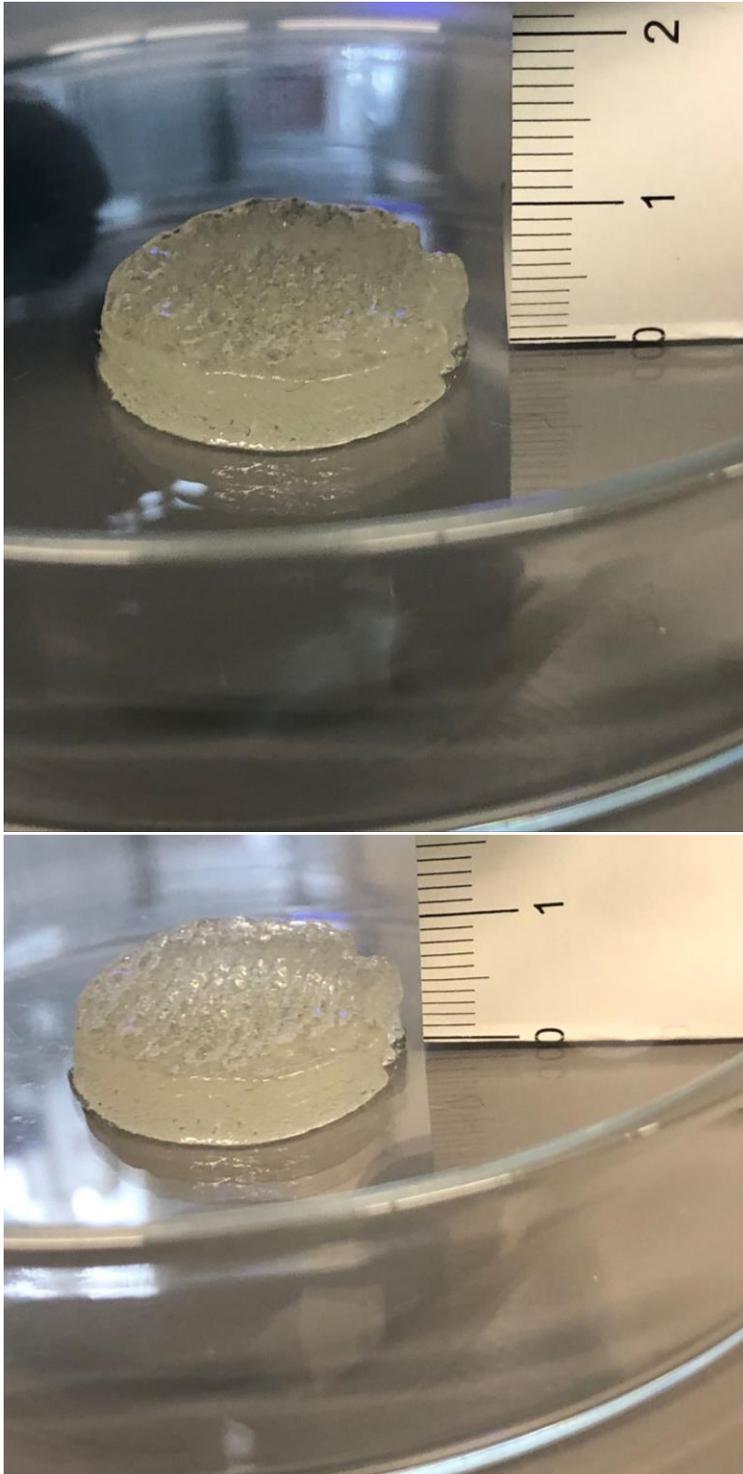


Figura 4.9 Visuale laterale di una griglia a 10 strati in cui l'altezza viene mantenuta.

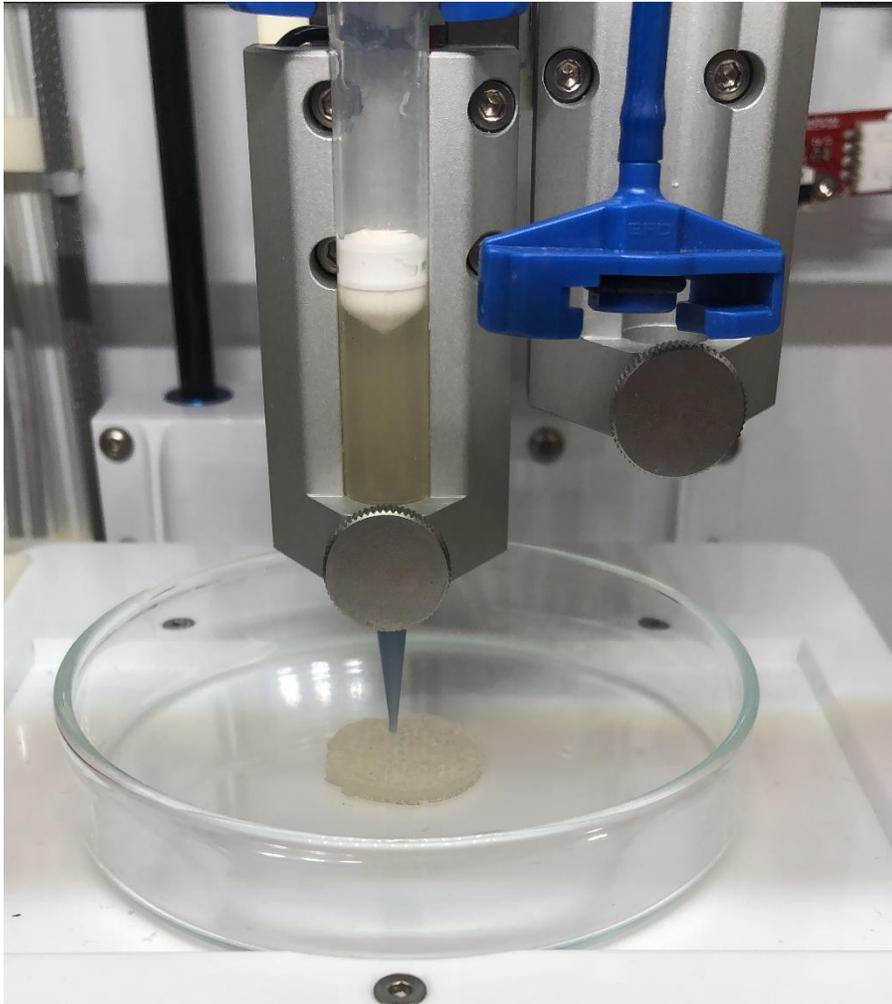


Figura 4.10 Stampa di una griglia a 10 strati tramite la stampante Inkredible +.

Capitolo 5: Conclusioni e sviluppi futuri

Nel corso dell'attività sperimentale sono stati prodotti e testati come bio-inchiostri vari blend polimerici composti da gelatina e alginato in concentrazioni variabili e mastica di Chios mantenuta a concentrazione costante dell'1%. Si è voluto evitare l'utilizzo di materiali o metodi di reticolazione, come ad esempio la GelMa, che non potessero garantire un futuro utilizzo in ambito alimentare nonostante siano ampiamente utilizzati in vari campi della medicina generativa.

È risultato che il gel composto da 5% gelatina, 5% alginato e 1% di mastice di Chios sia quello che ha soddisfatto maggiormente i requisiti di stampa richiesti tra cui le pressioni di stampa compatibili con la sopravvivenza cellulare e il mantenimento della struttura multistrato.

Dai risultati è emerso che la qualità di stampa del gel varia leggermente da prova a prova, questo è dettato anche da una variazione di temperatura all'interno del laboratorio che influisce sulle proprietà della gelatina. Una possibile soluzione potrebbe essere dettata dall'utilizzo di stampanti con piatti di stampa regolabili in temperatura in modo tale da settare una temperatura più fredda rispetto a quella a quella del luogo di lavoro, in modo tale da lavorare in condizioni controllate e garantendo una migliore forma dei filamenti che si depositano, o anche di utilizzare una stampante che permette di stampare a temperature di stampa inferiori rispetto alle temperature presenti all'interno del luogo di lavoro.

Il passo successivo dell'esperimento prevede il caricamento dello scaffold con cellule staminali adipose e cellule satelliti, ponendo il costruito di un bioreattore a perfusione confinata che permetta di differenziare le cellule tramite stimoli meccanici, sottoponendo il costruito a stimoli di trazione,

in questo modo si procederà a valutare se l'utilizzo della mastica Chios ha portato miglioramenti e benefici rispetto ad un gel in cui non viene previsto il suo utilizzo.

La ricerca per produrre carne sintetica nonostante sia piuttosto moderna, sta ottenendo risultati apprezzabili con estrema velocità, molte università e startup si sono cimentate in questo tipo di ricerca in modo da sviluppare il più velocemente possibile un prodotto economico, nutriente e facilmente riproducibile magari tramite l'utilizzo di sistemi semi-automatizzati.

Vi sono due criticità che necessitano di essere presentate, la prima riguarda il sapore del prodotto, il quale fino a ora non è paragonabile ad una classica bistecca ottenuta da animale, la seconda riguarda l'uso del siero fetale bovino (FBS).

Per la prima problematica si potrebbero effettuare degli studi sull'utilizzo di aromi da inserire nello scaffold prima della coltura dinamica, ad esempio l'interno dei vari fori della struttura a griglia utilizzata nel corso dell'esperimento di tesi potrebbero essere caricati da oli essenziali ottenuti da piante di cui normalmente un bovino da pascolo è solito cibarsi, con l'intenzione che vengano assimilati come nutrimento dalle cellule durante il periodo in coltura.

Il siero fetale bovino (FBS) risulta invece un problema più ingente rispetto al primo discusso, poiché se l'obiettivo finale è avere della carne evitando la macellazione dell'animale allora questo tipo di nutriente andrebbe sostituito, in quanto derivato dalla raccolta dal sangue di feti asportati da vacche gravide macellate nelle industrie lattiero-casearie o produttrici di carne [79], da un feto si ottiene solamente mezzo litro di sostanza. FBS ha il vantaggio di permettere a tutti i tipi di cellule animali a crescere e duplicarsi, mentre altri sieri animali funzionano per uno o due tipi cellulari.

Come menzionato più volte all'interno dei capitoli precedenti, uno dei fattori che si vuole cercare di abbattere è il costo, un litro di siero bovino fetale costa tra i 300 e i 700 € e occorrono 50 litri di siero per produrre un singolo hamburger di manzo.

Il lisato piastrinico potrebbe essere una valida alternativa al siero, si ottiene attraverso piastrine isolate dal sangue di donatori, da cui vengono utilizzate per la produzione di lisato piastrinico umano (hPL) tramite multipli cicli di gelo-disgelo per rilasciare grandi quantità di fattori di crescita che supportare l'espansione hMSC [80,81], al momento è ancora in fase di test con effetti positivi sulle cellule coinvolte tuttavia non vi è la certezza che si possano in futuro ottenere le quantità necessarie ad una produzione in scala industriale.

Per concludere, una volta superate le varie sfide che questo tipo di ricerca porta, il potenziale è davvero impressionante, da un lotto standard di 20.000 litri di cellule in coltura si produrrebbero tra 1.800 e 4.500 chilogrammi di carne effettiva, quindi senza la produzione di scarti animali come avverrebbe in fase di macellazione [82], .

Bibliografia

1. Higgs, Jennette. (2000). *The changing nature of red meat: 20 years of improving nutritional quality. Trends in Food Science & Technology*. 11. 85-95. 10.1016/S0924-2244(00)00055-8.
2. Larsen CS. *Animal source foods and human health during evolution. J Nutr*. 2003 Nov;133(11 Suppl 2):3893S-3897S. doi: 10.1093/jn/133.11.3893S. PMID: 14672287.
3. MANN, N. (2007), *Meat in the human diet: An anthropological perspective. Nutrition & Dietetics*, 64: S102-S107.
4. Pereira PM, Vicente AF. *Meat nutritional composition and nutritive role in the human diet. Meat Sci*. 2013 Mar;93(3):586-92. doi: 10.1016/j.meatsci.2012.09.018. Epub 2012 Oct 31. PMID: 23273468.
5. Finch, Caleb E., and Craig B. Stanford. "Meat-Adaptive Genes and the Evolution of Slower Aging in Humans." *The Quarterly Review of Biology*, vol. 79, no. 1, 2004, pp. 3–50. JSTOR, <https://doi.org/10.1086/381662>. Accessed 13 Sep. 2022.
6. W.J. Wang, R.H. Crompton, *Analysis of the human and ape foot during bipedal standing with implications for the evolution of the foot, Journal of Biomechanics, Volume 37, Issue 12, 2204, Pages 1831-1836, ISSN 0021-9290.*
7. M.A. Crawford, M.M. Gale, M.H. Woodford, N.M. Casped, *Comparative studies on fatty acid composition of wild and domestic meats, International Journal of Biochemistry, Volume 1, Issue 3, 1970, Pages 295-305, ISSN 0020-711X.*
8. Schuller-Levis G, Park E. *Is Taurine A Biomarker? Adv Clin Chem*. 2006;41:1-21. doi: 10.1016/S0065-2423(05)41001-X. Epub 2006 May 6. PMID: 28682746.
9. Derman, D.P., Bothwell, T.H., Torrance, J.D., Macphail, A.P., Bezwoda, W.R., Charlton, R.W. and Mayet, F.G.H. (1982), *Iron Absorption from Ferritin and Ferric Hydroxide. Scandinavian Journal of Haematology*, 29: 18-24.
10. P. Sans, P. Combris, *World meat consumption patterns: An overview of the last fifty years (1961–2011), Meat Science, Volume 109, 2015, Pages 106-111, ISSN 0309-1740.*
11. *Fao* 2012.

12. *Fao 2013.*
13. *Water and food security.*
14. *Bellet, C.; Rushton, J. World food security, globalisation and animal farming: Unlocking dominant paradigms of animal health science. Rev. Sci. Tech. 2019, 38, 383–393.*
15. *Chriki, S.; Hocquette, J.F. The Myth of Cultured Meat: A Review. Front. Nutr. 2020, 7, 7.*
16. *Biotechnological and Technical Challenges Related to Cultured Meat Production Davide Lanzoni, Filippo Bracco, Federica Cheli, Bianca Maria Colosimo, Davide Moscatelli , Antonella Baldi, Raffaella Rebucci and Carlotta Giromini.*
17. *Lifegate - Le foreste della Terra cambiano a due velocità. Il quadro globale tra deforestazione e boschi in crescita.*
18. *Fao 2015.*
19. *Smil, V. (2002), Eating Meat: Evolution, Patterns, and Consequences. Population and Development Review, 28: 599-639.*
20. *Williams, P. (2007). Nutritional composition of red meat. s4 The Role of. Nutrition and Dietetics, 64, S113–S119.*
21. *Gerber, N., Scheeder, M. R. L., & Wenk, C. (2009). The influence of cooking and fat trimming on the actual nutrient intake from meat. Meat Science, 81(1), 148–154.*
22. *Ono, K., Berry, B. W., & Paroczay, E. (1985). Journal of Food Science, 50(3), 701–706.*
23. *Kennedy, A., Martinez, K., Chuang, C., Lapoint, K., & Mcintosh, M. (2009). Saturated fatty acid-mediated inflammation and insulin resistance in adipose tissue. Mechanisms of Action and Implications, 1, 1–4.*
24. *Lombardi-Boccia, Ginevra, Lanzi, S., & Aguzzi, A. (2005). Aspects of meat quality: Trace elements and B vitamins in raw and cooked meats. Journal of Food Composition and Analysis, 18(1), 39–46.*
25. *Kumar, V., Sinha, A. K., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (2010). Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. Food Chemistry, 120(4), 945–959.*
26. *Clark, E. M., Mahoney, A. W., & Carpenter, C. E. (1997). Heme and total iron in ready-to-eat chicken \ddagger . Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45(1), 124–126.*
27. *Mills, K. C., & Curry, S. C. (1994). Acute iron poisoning. Emergency Medicine Clinics of North America, 12(2), 397–413.*

28. McCord, J. M. (1998). *Iron, free radicals, and oxidative injury*. *Seminars in Hematology*, 35(1), 5–12.
29. Kang, DH., Louis, F., Liu, H. et al. Engineered whole cut meat-like tissue by the assembly of cell fibers using tendon-gel integrated bioprinting. *Nat Commun* 12, 5059 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25236-9>.
30. Philippon DJ (2018) Changing food cultures, changing global environments. *Glob Environ* 11:4–11. <https://doi.org/10.3197/ge.2018.110101>.
31. Miller WM, Morrow CT (1975) Mechanical characterization of fibrous materials as related to meat analogs. *J Texture Stud* 6:473–487. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.1975.tb01422.x>.
32. Slade P (2018) If you build it, will they eat it? Consumer preferences for plant-based and cultured meat burgers. *Appetite* 125:428–437 <https://doi.org/10.1016/j.appet.2018.02.030>.
33. Zwart H (2015) Tailed food and the Icarus Complex: psychoanalysing consumer discontent from Oyster Middens to Oryx and Crake. *J Agric Environ Ethics* 28:255–274 <https://doi.org/10.1007/s10806-015-9530-6>.
34. Donaldson B (2016) *In the blink of an eye: reimagining our futures of food*. In: Donaldson B, Carter C (eds) *The future of meat without animals*. Rowman & Littlefield, London.
35. Post MJ (2014) Cultured beef: medical technology to produce food. *J Sci Food Agric* 94:1039–1041. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6474>.
36. Fernandes AM, de Souza Teixeira O, Palma Revillion JP, de Souza ÂRL. Conceptual evolution and scientific approaches about synthetic meat. *J Food Sci Technol*. 2020 Jun;57(6):1991-1999. doi: 10.1007/s13197-019-04155-0. Epub 2019 Nov 14. PMID: 32431325; PMCID: PMC7230089.
37. Stephens N, Silvio LD, Dunsford I, Ellis M, Glencross A, Sexton A (2018) Bringing cultured meat to market: technical, socio-political, and regulatory challenges in cellular agriculture. *Trends Food Sci Technol* 78:155–166. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.04.010>.

38. Winiwarter W, Leip A, Tuomisto HL, Haastrup PA (2014) European perspective of innovations towards mitigation of nitrogen-related greenhouse gases. *Curr Opin Environ Sustain* 9:37–45. <https://doi.org/10.1016/j.cosust.2014.07.006>.
39. McKinsey, Jordan Bar Am, Zafer Dallal Bashi, Angela Chen, Dimpy Jindal, Liane Ong, Derek Schlenker, Maria Schmidt, Warren Teichner *Cultivated meat: Out of the lab, into the frying pan* 2020.
40. Bomkamp, C., Skaalure, S. C., Fernando, G. F., Ben-Arye, T., Swartz, E. W., Specht, E. A., *Scaffolding Biomaterials for 3D Cultivated Meat: Prospects and Challenges*. *Adv. Sci.* 2022, 9, 2102908. <https://doi.org/10.1002/advs.202102908>.
41. A.Listrat,B.Lebret,I.Louveau,T.Astruc,M.Bonnet,L.Lefaucheur, B. Picard, J. Bugeon, *Sci. World J.* 2016, 2016, 3182746.
42. S.Das,K.D.Browne,F.A.Laimo,J.C.Maggiore,M.C.Hilman,H. Kaisaier, C. A. Aguilar, Z. S. Ali, F. Mourkioti, D. K. Cullen, *Commun. Biol.* 2020, 3, 330.
43. J.H.Kim,I.Kim,Y.-J.Seol,I.K.Ko,J.J.Yoo,A.Atala,S.J.Lee,*Nat. Commun.* 2020, 11, 1025.
44. D.Gholobova,L.Terrie,M.Gerard,H.Declercq,L.Thorrez,*Biomaterials* 2020, 235, 119708.
45. S.Levenberg,J.Rouwkema,M.Macdonald,E.S.Garfein,D.S.Kohane, D. C. Darland, R. Marini, C. A. van Blitterswijk, R. C. Mulligan, P. A. D'Amore, R. Langer, *Nat. Biotechnol.* 2005, 23, 879.
46. J. R. Gershlak, S. Hernandez, G. Fontana, L. R. Perreault, K. J. Hansen, S. A. Larson, B. Y. K. Binder, D. M. Dolivo, T. Yang, T. Dominko, M. W. Rolle, P. J. Weathers, F. Medina-Bolivar, C. L. Cramer, W. L. Murphy, G. R. Gaudette, *Biomaterials* 2017, 125, 13.
47. H. Lodish, A. Berk, S. Lawrence Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 4th ed., Freeman, New York, 2000.
48. A.R.Gillies,R.L.Lieber,*MuscleNerve*2011,44,318.
49. *Appunti corso di valutazione funzionale e riabilitazione motoria 2020/2021 Galli-Frigo (Politecnico di Milano)*.
50. *Manuela T. Raimondi - Handouts for Technologies for regenerative medicine course 2020-2021 (Politecnico di Milano)*.
51. I. Levental, P. C. Georges, P. A. Janmey, *Soft Matter* 2007, 3, 299.

52. T. Ben-Arye, Y. Shandalov, S. Ben-Shaul, S. Landau, Y. Zagury, I. Ianovici, N. Lavon, S. Levenberg, *Nature Food* 2020, 1, 210.
53. Lanzoni, D.; Bracco, F.; Cheli, F.; Colosimo, B.M.; Moscatelli, D.; Baldi, A.; Rebutti, R.; Giromini, C. *Biotechnological and Technical Challenges Related to Cultured Meat Production*. *Appl. Sci.* 2022, 12, 6771. <https://doi.org/10.3390/app12136771>.
54. Ong, K.J.; Johnston, J.; Datar, I.; Sewalt, V.; Holmes, D.; Shatkin, J.A. *Food safety considerations and research priorities for the cultured meat and seafood industry*. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2021, 20, 5421–5448.
55. O'Brien, F. *Biomaterials & scaffolds for tissue engineering*. *Mater. Today* 2011, 14, 88–95.
56. Seah, J.; Singh, S.; Tan, L.; Choudhury, D. *Scaffolds for the manufacture of cultured meat*. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2021, 42, 311–323.
57. K. J. Ong, J. Johnston, I. Datar, V. Sewalt, D. Holmes, J. A. Shatkin, *Authorea* 2021
58. Moroni, L.; Burdick, J.; Highley, C.; Lee, S.J.; Morimoto, Y.; Takeuchi, S.; Yoo, J. *Biofabrication strategies for 3D in vitro models and regenerative medicine*. *Nat. Rev. Mater.* 2018, 3, 21–37.
59. Handral, H.; Tay, S.; Chan, W.W.; Choudhury, D. *3D Printing of cultured meat products*. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2020, 62, 272–281.
60. Rosser, J.; Thomas-Vazquez, D. *Bioreactor processes for maturation of 3D bioprinted tissue*. In *3D Bioprinting for Reconstructive Surgery, 1st ed.*; Whitaker, T.J., Ed.; Elsevier Wordmark: Amsterdam, The Netherlands, 2018.
61. Post, M.; Levenberg, S.; Kaplan, D.; Genovese, N.; Fu, J.; Bryant, C.; Negowetti, N.; Verzijden, K.; Moutsatsou, P. *Scientific, sustainability and regulatory challenges of cultured meat*. *Nat. Food.* 2020, 1, 403–415.
62. Specht, E.; Welch, D.; Clayton, E.; Lagally, C. *Opportunities for Applying Biomedical Production and Manufacturing Methods to the Development of the Clean Meat Industry*. *Biochem. Eng. J.* 2018, 132, 161–168.
63. Nienow, A.W. *A potentially scalable method for the harvesting of hMSCs from microcarriers*. *Biochem. Eng. J.* 2014, 85, 79–88.

64. Reiss, J.; Robertson, S.; Suzuki, M. *Cell Sources for Cultivated Meat: Applications and Considerations throughout the Production Workflow*. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 7513.
65. Mulvaney, D.R.; Marple, D.N.; Merkel, R.A. *proliferation of skeletal muscle satellite cells after castration and administration of testosterone propionate*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1988, 188, 40–45.
66. Vestergaard, M.; Oksbjerg, N.; Henckel, P. *Influence of feeding intensity, grazing and finishing feeding on muscle fibre characteristics and meat colour of semitendinosus, longissimus dorsi and supraspinatus muscles of young bulls*. *Meat Sci.* 2000, 54, 177–185.
67. Santoro M, Tatara AM, Mikos AG. *Gelatin carriers for drug and cell delivery in tissue engineering*. *J Control Release.* 2014; 190:210-218.
68. Wang H, Boerman OC, Sariibrahimoglu K, Li Y, Jansen JA, Leeuwenburgh SCG. *Comparison of micro- vs. Nanostructured colloidal gelatin gels for sustained delivery of osteogenic proteins: Bone morphogenetic protein-2 and alkaline phosphatase*. *Biomaterials.* 2012; 33(33):8695–8703.
69. Elzoghby AO. *Gelatin-based nanoparticles as drug and gene delivery systems: Reviewing three decades of research*. *J Control Release.* 2013; 172(3):1075–1091.
70. Xue D, Zhang W, Chen E, et al. *Local delivery of HMGB1 in gelatin sponge scaffolds combined with mesenchymal stem cell sheets to accelerate fracture healing*. *Oncotarget.* 2017;8(26):42098-42115.
71. *Appunti corso di Strutture bioartificiale e biomimetiche, S. Farè, Politecnico di Milano, 2020-2021. Kuen Yong Lee, David J. Mooney, Alginate: Properties and biomedical applications* *Progress in Polymer Science, Volume 37, Issue 1, 2012, Pages 106-126, ISSN 0079-6700.*
72. Lee KY, Mooney DJ. *Alginate: properties and biomedical applications*. *Prog Polym Sci.* 2012 Jan;37(1):106-126. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003. PMID: 22125349; PMCID: PMC3223967.
73. Dimas KS, Pantazis P, Ramanujam R. *Review: Chios mastic gum: a plant-produced resin exhibiting numerous diverse pharmaceutical and biomedical properties*. *In Vivo.* 2012 Sep-Oct;26(5):777-85. PMID: 22949590.

74. Marone P, Bono L, Leone E, Bona S, Carretto E and Perversi LJ: Bactericidal activity of *Pistacia lentiscus* mastic gum against *Helicobacter pylori*. *Chemotherapy* 13: 611-614, 2001.
75. Choli-Papadopoulou T, Kottakis F, Papadopoulos G and Pendas, S: *Helicobacter pylori* neutrophil activating protein as target for new drugs against *H. pylori* inflammation. *World J Gastroenterol* 17: 2585-2591, 2011.
76. Zhou L, Satoh K, Takahashi K, Watanabe S, Nakamura W, Maki J, Hatano H, Takekawa F, Shimada C and Sakagami H: Re- evaluation of anti-inflammatory activity of mastic using activated macrophages. *In Vivo* 23: 583-589, 2009.
77. Mahmoudi M, Ebrahimzadeh MA, Nabavi SF, Hafezi S, Nabavi SM and Eslami SH: Antiinflammatory and antioxidant activities of gum mastic. *Eur Rev Med Pharmacol Sc* 14: 765-976, 2010.
78. Triantafyllou A, Bikineyeva A, Dikalova A, Nazarewicz R, Lerakis S and Dikalov S: Anti-inflammatory activity of Chios mastic gum is associated with inhibition of TNF-alpha induced oxidative stress. *Nutr J* 10: 64, 2011.
79. Matt Reynolds: The clean meat industry is racing to ditch its reliance on foetal blood, *Science*, 20/03/2018.
80. P. Iudicone, D. Fioravanti, G. Bonanno, M. Miceli, C. Lavorino, P. Totta, L. Frati, M. Nuti, L. Pierelli, Pathogen-free, plasma-poor platelet lysate and expansion of human mesenchymal stem cells, *J. Transl. Med.* 12 (2014) 28.
81. Aletta C. Schnitzler, Anjali Verma, Daniel E. Kehoe, Donghui Jing, Julie R. Murrell, Kara A. Der, Manjula Aysola, Peter J. Rapiejko, Sandhya Punreddy, Martha S. Rook, Bioprocessing of human mesenchymal stem/stromal cells for therapeutic use: Current technologies and challenges, *Biochemical Engineering Journal*, Volume 108, 2016, Pages 3-13, ISSN 1369-703X.
82. Specht, Elizabeth & Welch, David & Clayton, Erin & Lagally, Christie. (2018). *Opportunities for Applying Biomedical Production and Manufacturing Methods to the Development of the Clean Meat Industry*. *Biochemical Engineering Journal*. 132. 10.1016/j.bej.2018.01.015.
83. K.D.Fish,N.R.Rubio,A.J.Stout,J.S.K.Yuen,D.L.Kaplan,Trends Food Sci. Technol. 2020, 98, 53.

84. G. H. Borschel, R. G. Dennis, W. M. Kuzon Jr., *Plast. Reconstr. Surg.* 2004, 113, 595.
85. C. F. Bellani, J. Ajeian, L. Duffy, M. Miotto, L. Groenewegen, C. J. Connon, *Front Nutr.* 2020, 7, 575146.
86. S. Ng, M. Kurisawa, *Acta Biomater.* 2021, 124, 108.
87. C. Lai, S. J. Zhang, L. Q. Wang, L. Y. Sheng, Q. Z. Zhou, T. F. Xi, *J. Mater. Chem. B* 2015, 3, 9001.
88. D. J. Modulevsky, C. M. Cuerrier, A. E. Pelling, *PLoS One* 2016, 11, 0157894.
89. J. J. Breemhaar, *M. Post*, US20190338232:A1, 2019.
90. A. Nishiguchi, M. Matsusaki, S. Miyagawa, Y. Sawa, M. Akashi, *Adv. Healthcare Mater.* 2015, 4, 1164.
91. D. Gholobova, L. Terrie, K. Mackova, L. Desender, G. Carpentier, M. Gerard, L. Hympanova, J. Deprest, L. Thorrez, *Biofabrication* 2020, 12, 035021.
92. J. Rnjak-Kovacina, L. S. Wray, J. M. Golinski, D. L. Kaplan, *Adv. Funct. Mater.* 2014, 24, 2188.
93. S. Derakhti, S. H. Safiabadi-Tali, G. Amoabediny, M. Sheikhpour, *Mater. Sci. Eng., C* 2019, 103, 109782.
94. L. T. B. Nguyen, A. O. O. Odeleye, C.-Y. Chui, T. Baudequin, Z. Cui, H. Ye, *Sci. Rep.* 2019, 9, 3477.
95. T. Ben-Arye, S. Levenberg, *Front. Sustainable Food Syst.* 2019, 3, 46.
96. S. C. Shit, P. M. Shah, *J. Polym. Environ.* 2014, 2014, 427259.
97. K.-H. Chang, H.-T. Liao, J.-P. Chen, *Acta Biomater.* 2013, 9, 9012.
98. J. Johnson, US20160317706:A1, 2016.
99. C. O. Chantre, P. H. Campbell, H. M. Golecki, A. T. Buganza, A. K. Capulli, L. F. Deravi, S. Dauth, S. P. Sheehy, J. A. Paten, K. Gledhill, Y. S. Doucet, H. E. Abaci, S. Ahn, B. D. Pope, J. W. Ruberti, S. P. Hoerstrup, A. M. Christiano, K. K. Parker, *Biomaterials* 2018, 166, 96.
100. S. Ahn, C. O. Chantre, A. R. Gannon, J. U. Lind, P. H. Campbell, T. Grevesse, B. B. O'Connor, K. K. Parker, *Adv. Healthcare Mater.* 2018, 7, 1701175.
101. F. E. Freeman, D. J. Kelly, *Sci. Rep.* 2017, 7, 17042.
102. M. Levy-Mishali, J. Zoldan, S. Levenberg, *Tissue Eng., Part A* 2009, 15, 935.
103. K. J. M. Boonen, K. Y. Rosaria-Chak, F. P. T. Baaijens, D. W. J. van der Schaft, M. J. Post, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2009, 296, C1338.
104. R. J. Hickey, D. J. Modulevsky, C. M. Cuerrier, A. E. Pelling, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2018, 4, 3726.

105. M. Furuhashi, Y. Morimoto, A. Shima, F. Nakamura, H. Ishikawa, S. Takeuchi, *npj Sci. Food* 2021, 5, 6.
106. A. Shapira, T. Dvir, *Adv. Sci.* 2021, 8, 2003751.
107. J. S. Miller, *PLoS Biol.* 2014, 12, 1001882.
108. A. W. Feinberg, J. S. Miller, *MRS Bull.* 2017, 42, 557.
109. J. H. Kim, Y.-J. Seol, I. K. Ko, H.-W. Kang, Y. K. Lee, J. J. Yoo, A. Atala, S. J. Lee, *Sci. Rep.* 2018, 8, 12307.
110. A. Shahin-Shamsabadi, P. R. Selvaganapathy, *Cells Tissues Organs* 2021.
111. N. Vogt, *Nat. Methods* 2021, 18, 27.
112. P. Sinke, I. Odegard, *LCA of Cultivated Meat Future Projections for Different Scenarios*, CE Delft, Netherlands 2021.
113. R. Vergeer, P. Sinke, I. Odegard, *TEA of Cultivated Meat Future Projections of Different Scenarios*, CE Delft, Netherlands 2021.
114. D. Risner, F. Li, J. S. Fell, S. A. Pace, J. B. Siegel, I. Tagkopoulos, E. S. Spang, *Foods* 2021, 10, 3
115. L. A. MacQueen, C. G. Alver, C. O. Chantre, S. Ahn, L. Cera, G. M. Gonzalez, B. B. O'Connor, D. J. Drennan, M. M. Peters, S. E. Motta, ^{[[SEP]]}J. F. Zimmerman, K. K. Parker, *npj Sci. Food* 2019, 3, 20.
116. J. Zeltinger, J. K. Sherwood, D. A. Graham, R. Müller, L. G. Griffith, *Tissue Eng.* 2001, 7, 557.
117. K. J. M. Boonen, D. W. J. van der Schaft, F. P. T. Baaijens, M. J. Post, *J. Tissue Eng. Regener. Med.* 2011, 5, 60.
118. A. J. Engler, M. A. Griffin, S. Sen, C. G. Bönnemann, H. L. Sweeney, D. E. Discher, *J. Cell Biol.* 2004, 166, 877.
119. E. M. Chandler, C. M. Berglund, J. S. Lee, W. J. Polacheck, J. P. Gleghorn, B. J. Kirby, C. Fischbach, *Biotechnol. Bioeng.* 2011, 108, 1683.
120. J. S. Jurvelin, M. D. Buschmann, E. B. Hunziker, *J. Biomech.* 1997, 30, 235.
121. V. Perez-Puyana, P. Wieringa, Y. Yuste, F. de la Portilla, A. Guerro, A. Romero, L. Moroni, *J. Biomed. Mater. Res., Part A* 2021, 109, 1600.
122. M. Zhu, Y. Wang, G. Ferracci, J. Zheng, N.-J. Cho, B. H. Lee, *Sci. Rep.* 2019, 9, 6863.
123. N. W. Freund, M. S. Croughan, *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 385
124. M. Rad-Malekshahi, M. Flement, W. E. Hennink, E. Mastrobattista, *Microb. Cell Fact.* 2014, 13, 178.
125. A. Tinagar, K. Jaenes, K. Pardee, *BMC Biol.* 2019, 17, 64

126. R. Mohammadinejad, A. Shavandi, D. S. Raie, J. Sangeetha, M. Soleimani, S. S. Hajibehzad, D. Thangadurai, R. Hospet, J. O. Popoola, A. Arzani, M. A. Gómez-Lim, S. Iravani, R. S. Varma, *Green Chem.* 2019, 21, 1845.
127. H. Lin, Q. Du, Q. Li, O. Wang, Z. Wang, K. Liu, C. Elowsky, C. Zhang, Y. Lei, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2018, 10, 29238.
128. Q. Li, H. Lin, Q. Du, K. Liu, O. Wang, C. Evans, H. Christian, C. Zhang, Y. Lei, *Biofabrication* 2018, 10, 025006.

Lista delle figure

| | |
|---|-----------|
| <i>Figura 1.1 Struttura della molecola di taurina e cisteina</i> | <i>10</i> |
| <i>Figura 1.2 Consumo (in KG) di carne pro-capite annuo nel mondo, anno 2011</i> | <i>11</i> |
| <i>Figura 1.3 Produzione (in KG) di carne per nazione durante l'anno 2011</i> | <i>12</i> |
| <i>Figura 2.1 Timeline contenente le principali pubblicazioni sulla carne sintetica</i> | <i>21</i> |
| <i>Figura 2.2 Rappresentazione schematica della struttura gerarchica del muscolo vertebrato</i> | <i>23</i> |
| <i>Figura 2.3 Fasi per la produzione di carne sintetica</i> | <i>32</i> |
| <i>Figura 2.4 Struttura della bistecca</i> | <i>43</i> |
| <i>Figura 2.5 Schema del processo di produzione della bistecca ingegnerizzata</i> | <i>44</i> |
| <i>Figura 2.6 Rappresentazione dello schema del TIP per la stampa cellulare</i> | <i>49</i> |
| <i>Figura 2.7 Risultato finale della bistecca ottenuta</i> | <i>49</i> |
| <i>Figura 3.1 Rappresentazione della struttura a egg-box dell'alginato.....</i> | <i>54</i> |
| <i>Figura 3.2 Prova per il mantenimento della forma del filamento per gel composto da 7% di gelatina</i> | <i>57</i> |
| <i>Figura 3.3 Prova per il mantenimento della forma del filamento per gel composto dal 10% di gelatina</i> | <i>58</i> |
| <i>Figura 3.4 Serpentina</i> | <i>64</i> |
| <i>Figura 3.5 Struttura finale dello scaffold</i> | <i>65</i> |
| <i>Figura 3.6 Stampante Inkredible +</i> | <i>74</i> |
| <i>Figura 4.1 Confronto tra gel 6%Gelatina-2%alginato e gel 6%alginato-2%Gelatina estrusi tramite siringa e lasciati in incubatore sia reticolati da CaCl₂che non reticolati</i> | <i>78</i> |
| <i>Figura 4.2 Serpentina ad anse regolari stampata con temperatura di stampa impostata a 26°C e pressione di 70 Kpa</i> | <i>80</i> |
| <i>Figura 4.3 Serpentina con anse di dimensioni variabili stampata con temperatura di stampa impostata a 26°C e pressione di 70 Kpa</i> | <i>81</i> |
| <i>Figura 4.4 Stampa di una griglia a 2 strati composta da gel 4% gelatina 4% alginato</i> | <i>82</i> |
| <i>Figura 4.5 Griglia stampata con gel 6% Gelatina + 6% Alginato + 1% Mastice di Chios</i> | <i>84</i> |
| <i>Figura 4.6 Griglia stampata con gel 7% Gelatina + 5% Alginato + 1% Mastice di Chios</i> | <i>84</i> |
| <i>Figura 4.7 Risultato della stampa e reticolazione di una griglia a 2 strati del gel 5% Gelatina</i> | |

| | |
|---|-----------|
| <i>+5% Alginato + 1% Mastice di Chios</i> | <i>85</i> |
| <i>Figura 4.8 Differenze tra due prove di stampa di una griglia a 10 strati, utilizzando il medesimo gel di</i> | |
| <i>5% Gelatina + 5% Alginato + 1% Mastice di Chios</i> | <i>86</i> |
| <i>Figura 4.9 Visuale laterale di una griglia a 10 strati in cui è possibile apprezzare l'altezza</i> | |
| <i>mantenuta dal costrutto composto da 5% Gelatina + 5% Alginato + 1% Mastice di Chios</i> | |
| <i>.....</i> | <i>87</i> |
| <i>Figura 4.10 Stampa di una griglia a 10 strati tramite la stampante Inkredible +</i> | <i>88</i> |

Lista delle tabelle

| | |
|---|-----------|
| <i>Tabella 1.1 Confronto tra una dieta in cui viene consumata principalmente carne e una basata sul consumo di vegetali</i> | <i>8</i> |
| <i>Tabella 1.2 Valori nutrizionali in 100g di prodotto per differenti tagli di carne</i> | <i>16</i> |
| <i>Tabella 2.1 Differenze tra ingegneria dei tessuti e produzione carne sintetica</i> | <i>30</i> |
| <i>Tabella 2.2 Vantaggi e gli svantaggi per le principali tipologie di scaffold</i> | <i>35</i> |
| <i>Tabella 2.3 criteri di progettazione dello scaffold</i> | <i>36</i> |
| <i>Tabella 2.4 Vantaggi e svantaggi per l'utilizzo di varie classi di materiali per la produzione di carne ingegnerizzata</i> | <i>38</i> |
| <i>Tabella 3.1 Tempo di scioglimento del gel in base alla % di gelatina</i> | <i>56</i> |
| <i>Tabella 3.2 Tempo di gelazione del gel in base alla % di gelatina</i> | <i>57</i> |
| <i>Tabella 3.3 Perdita di peso dei gel a distanza di 1, 24 e 72 ore</i> | <i>59</i> |
| <i>Tabella 4.1 Gel testati nella fase pre-stampa e motivi del loro fallimento</i> | <i>60</i> |