

# 세포기반 단백질식품 개발을 위한 일차세포 (Primary Cells)의 생산기법

Primary Cells Production and Control for Cell-Based Protein Food

박상훈, 박규태, 오세혁, 최정석\*

(Sanghun Park, Gyutae Park, Sehyuck Oh, Jungseok Choi\*)

충북대학교 축산학과

Department of Animal Science, Chungbuk National University

## I. 서론

전 세계의 해결해야 할 문제 중 하나인 미래 식량 및 동물성 단백질 식품 생산의 지속성 문제 해결책으로 '세포 배양육(Cell-cultured meat)' 기술 개발이 주목받고 있다. 현재(2023년 5월) 전 세계인구는 약 80억 명으로 집계되고 있으며, 이 수치는 2000년도 기준 약 61억 명에 비해 약 31% 증가한 수치이다. 또한, 전 세계인구는 2037년에 약 90억 명, 2058년에는 100억 명에 도달할 것으로 예상되고 있다(Worldometer, 2023). 국내에서는 현대인들의 식습관이 곡류 및 채식 위주에서 육류 위주로 변화하여 고기소비가 꾸준히 증가하고 있다(OECD-FAO, 2022). 전문가들은 세계인구 증가, 육류소비량 증가 및 급격한 기후변화 등에 의해 식량을 생산하는데, 환경적으로 제한적인 문제와 자원의 지속성뿐만 아니라 윤리적인 부분 또한 더욱 악화될 것으로 판단하고 있다. 이러한 복합적인 문제를 해결할 하나의 대비책으로 제시된 세포 배양육 기술은 전 세계적으로 관심을 받고 있으며 급속도로 발전하고 있다. 2013년 네덜란드 마크포스트 교수가 소 고기 배양육 패티를 선보인 이후 많은 기업과 연구자들이 관심을 가졌으며(TEDx, 2013), 현재 전 세계 대체육 및 배양육 회사는 약 1,400개 정도로 많이 생겨나고 있다(그림 1).

세포 배양육이란 가축의 세포를 채취하여 체외에서 배양시켜 고기와 가까운 외형, 성분, 맛, 기능성 등을 모사한 식용 가능한 동물성 단백질 식품을 의미한다. 현재 기술에서, 세포 배양육을 생산하기 위해서는 우리가 예상하는 것보다 훨씬 더 이화학적으로 복잡한 과정이 이루어진다. 첫 번째로 가축의 특정 기관이나 조직에서 세포배양육 생산을 위해 직접적으로 추출되는 줄기세포 즉, 일차 세포(Primary cells)를 추출한다. 일차 세포는 가축에서 소모 및 손상된 조직을 재생하

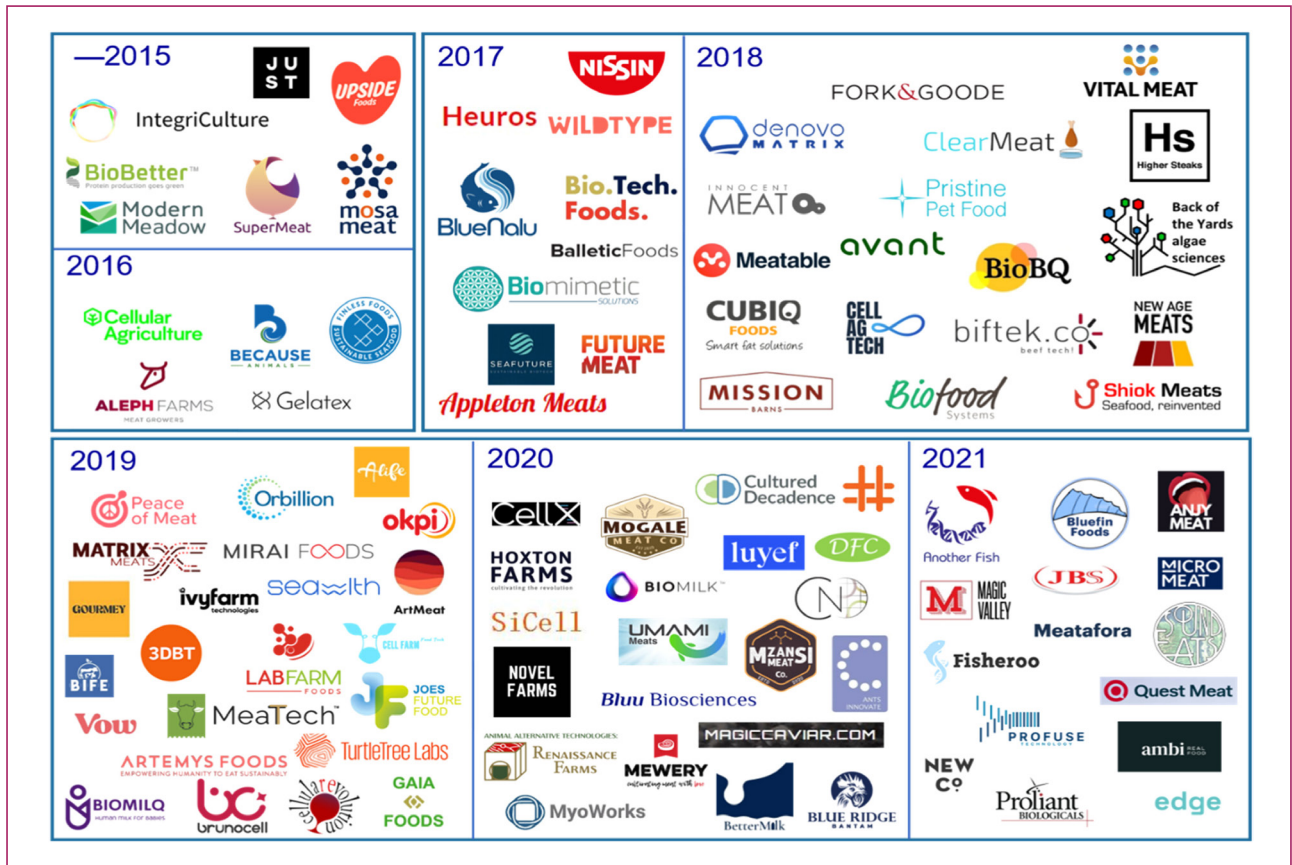
\*Corresponding author: Jungseok Choi

Department of Animal Science, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea

Tel: +82-43-261-2551, Fax: +82-43-261-2773

Email: jchoi@chungbuk.ac.kr

그림 1. 연도별 전세계의 배양육 생산기업 (Ye et al., 2022)



는 역할을 하는 줄기세포를 포함한다. 일차세포는 체외에서 한정적으로 증식하기 때문에 세포 배양육의 대량생산을 위해서는 가축 체내환경과 비슷하거나, 보다 발전된 체외환경에서 배양되어야 한다. 또한 지속적으로 일차세포를 공급할 수 있는 공여 가축이 필요하다. 이 과정은 기존 축산업과 협업이 필요하며, 일차세포를 가축에서 얻는 천연자원으로 여길 수 있고, 세포추출을 위한 가축 사육이라는 새로운 형태의 축산업 분야가 생길 수 있다. 한편, 배아 줄기세포주(Embryonic stem cell), 유도 만능줄기세포주(Induced pluripotent stem cell line)는 이론상 세포가 무한정으로 증식하고 균일한 품질을 유지하여 이들을 활용하여 세포 배양육의 생산이 가능하다. 하지만, 두 세포주는 식용에 적합하지 않은 화학물질 및 GMO기술을 사용할 수 있기 때문에 이들을 활용하여 세포 배양육을 생산할 시 소비자들의 부정적인 인식을 불러일으킬 수 있어 이

용에 제한이 있을 수 있다. 이후 추출된 세포는 여러 집단의 세포로 혼합되어 있으며, 고기를 모방한 품질의 제품으로 생산하기 위해 고순도의 근육, 지방세포 등으로 정제과정이 필요하다. 대량의 세포 배양을 위해서는 스타터 배양균 생산과정을 모방하여 모배양에서 중간배양, 벌크배양까지 3차원(3D) 배양이 가능하고, 세포의 성장단계별로 적절한 배양액과 지지체(Scaffold) 공급이 가능한 대규모 설비가 필요하다. 이후 대량의 배양 세포 조직물 가공까지의 전체 과정이 연속적으로 이루어져야 하며, 안전성과 관련 법도 고려하여 생산되어야 한다. 모든 과정이 복잡하게 얽혀 있고 중요한 과정이지만, 결국 세포 배양육 생산의 시작은 배양육의 씨앗인 고품질의 세포 생산과 품질 관리이다. 고효율, 고품질 세포 생산이 세포 배양육 생산의 모든 과정을 좌우할 수 있을 만큼 그 중요성이 매우 크다. 현재 배양육 생산 기술에서 근육세포와 지방세포의 체계

적인 확보가 세포 배양육의 직접적인 원료로서 가장 중요하다고 할 수 있다. 따라서 가축의 근육세포와 지방세포의 생산과 정제법을 확인하고, 이를 통해 고기에 가까운 세포 배양육 생산을 위한 기반을 제시하고자 한다.

## II. 본론

### 1. Primary Cells의 분리(Isolation) 기법

가축의 일차 세포를 배양하기 위해서는 살아있는 가축의 신체 조직이나 도축된 가축에서 세포를 추출해야 한다. 다양한 유전적, 환경적 조건은 가축에서 분리된 세포의 수율에 영향을 끼친다. 세포를 채취하는 조직의 위치(Ding et al., 2017; Redshaw et al., 2010), 채취 대상이 되는 가축의 나이(Chakravarthy et al., 2000, Gibson & Schultz, 1983), 또는 품종, 유전자, 성별이 그 조건이다(Day et al., 2010).

조직은 하나의 세포로만 이루어지지 않고 다양한 줄기세포의 집단으로 구성되어 있다. 그러므로 목표로 하는 세포가 많이 분포한 조직을 선정하는 것이 중요하며, 그 조직에서 원하는 세포를 효율적으로 분리해야 한다. 표 1은 품종과 세포 유형에 따라 분리방법 및 효소 종류를 나타낸 표이다. 일반적으로 collagenase, pronase, trypsin과 같은 효소들은 생체조직을 물리적으로 다지거나, 자른 후 특정 세포의 정제를 위해 사용되었다(Choi et al., 2021; Chakravarthy et al., 2000). 위 효소들은 연조직에서 collagen, fibronectin 등과 같은 ECM (Extracellular matrix)을 분해하여 세포를 정제할 때 사용이 된다(Nawi and Pinguun-Murphy, 2009). 효소 처리 이후 다양한 세포와 조직 조각들이 해리된 상태에서 세포의 크기와 무게 차이에 따라 여과하는 과정, 즉 원심 분리 및 필터를 이용하여 원하는 세포를 최대한 효율적으로 분리한다.

근육 분화를 위한 세포로 근육조직으로부터 채취된 위성세포(Satellite cells)는 골격근의 복구를 담당하고 있으며, 근섬유의 기저판과 원형질막 사이에 위치해 있다

(Kuang et al., 2007; Danoviz & Yablonka-Reuveni, 2012). 근육 위성세포를 얻기 위해선 살아있는 가축이나 도체에서 근육조직을 채취한 후 육안으로 식별이 가능한 결합조직, 혈관, 지방조직은 제거한다. 남은 근육조직을 잘게 다진 후 효소가 첨가된 용액에 넣어 ECM과 같은 물질을 분해시키고, 원심분리하면 근육 위성세포를 추출할 수 있다.

맛 형성에 필수적인 지방 분화를 위한 지방세포를 분리하는 방법은 1960년대 Rodbell에 의해 개발되었다(Rodbell, 1964). 쥐의 지방 조직을 추출해 잘게 썰어내고, 오염된 조혈세포를 제거하기 위해 세척을 한다. 그 후, 세척된 조직 조각에 collagenase를 이용하여 ECM과 같은 물질을 분해시킨다. 그리고 원심분리를 이용하여 생성된 펠렛 SVF(Stromal vascular fraction)를 채취한다.

구조적이나 조직형성에 관련한 섬유아세포는 폐 간질에서 가장 풍부한 세포이며, collagen, elastin, proteoglycans 등의 생성에 중요한 역할을 한다(Xu et al., 2016). 다른 세포의 분류 과정과 유사하게, 잘 다져진 조직을 collagenase이나 trypsin과 같은 효소를 이용하여 ECM과 같은 물질을 분해한 후, 원심분리를 통해 세포를 채취할 수 있다.

이러한 과정을 거쳐 추출한 세포가 목표로 하는 세포인지 확인한 후 사용될 수 있다. 효소를 이용한 해리와 원심 분리를 통해 분리한 세포는 체세포, 혈액 세포, 간질 세포 등의 다양한 세포가 포함되어 있기 때문에 순수하게 정제된 세포로 보기엔 어렵다. 지방에서 추출된 SVF의 경우에도 혈액 세포, 섬유아 세포, 혈관주위 세포, 내피 세포 그리고 전지방세포로 구성되어 있으며(Rosen & Spiegelman, 2014), 이러한 다양한 세포의 구성은 실험에 오류를 일으키거나, 세포 배양육 생산 시 다양한 변수를 만들어낼 수 있다. 그렇기 때문에 고도로 정제된 세포를 얻기 위해서는 세포의 분류(sorting) 작업이 필수적이다.

### 2. Primary Cells의 분류(Sorting) 기법

골격근은 근육 섬유, 위성세포 및 섬유-지방 전구세

표 1. 품종과 세포 유형에 따른 분리방법 및 효소 종류

Species	Cell type	Enzymes for muscle dissociation	Sorting methods	References
Cattle	SC	Type II collagenase	FACS	Ding et al., 2018
Cattle	SMC	Pronase	Percoll gradient	Sadkowski et al., 2018
Hanwoo	SC	Type II collagenase	FACS	Park et al., 2022
Chicken	SC	Type I collagenase	Percoll gradient	Yablonka-Reuveni et al., 1987
Chicken	SMC	Trypsin	Percoll gradient	Yablonka-Reuveni et al., 1988
Goat	SC	Pronase	Percoll gradient	Wang et al., 2020, Li et al., 2015
Goat	SC	Type I collagenase	Preplating	Sui et al., 2018
Mouse	SMC	Type II collagenase	Preplating	Hindi et al., 2017
Mouse	SC	Type II collagenase	MACS	Motohashi et al., 2014
Mouse	SC	Pronase	Preplating	Machida et al., 2004
Mouse	SMC	Type I collagenase	MACS preplating	Musarò & Carosio, 2017
Mouse	SMC	Type I collagenase	FACS	Urbani et al., 2012
Pig	SC	Collagenase D + dispase II	FACS	Ding et al., 2017
Pig	SC	Trypsin	Percoll gradient	Miersch et al., 2018
Pig	SC	Protease	Percoll gradient	Mesires and Doumit, 2002
Fish	Muscle cell	Type I collagenase	-	Fauconneau and Paboeuf, 2000
Fish	Muscle cell	Type II collagenase	-	Saad et al., 2023
Pig	ASCs	Type I collagenase	FACS	Arrizabalaga & Nollert, 2017
Mouse	ASCs	Type I collagenase	FACS	Yamamoto et al., 2014
Cattle	ASCs	-	FACS	Wilson et al., 2019
Cattle	SVF	Type I collagenase	-	Rojewski et al., 2008
Mouse	ASCs	Type I collagenase	FACS	Church et al., 2014
Rat	ASCs	Collagenase type 1A	Percoll gradient	Rada et al., 2011

FACS: fluorescence-activated cell sorting; MACS: magentic-activated cell sorting; SC: satellite cell; ASCs: adipocyte-derived stem cells; SMC: skeletal muscle cell.

포(Fibro adipogenic progenitors) 등을 포함한 수많은 단핵 및 다핵 세포를 포함하는 매우 복잡한 조직이다(그림 2). 그렇기에, 생체 조직에서 세포 배양을 생산 시 필요한 특정 primary cell을 추출하기 위해서는 추가적인 분류작업이 필요하다. 세포를 분류하는 기술로는 Density gradient centrifugation, Pre-plating, FACS(Fluorescence-activated cell sorting) 및 MACS(Magnetic-activated cell sorting) 등이 있다(그림 3). 표 2는 언급했던 세포 분류 기술들의 장·단

점을 정리한 표이다. Density gradient centrifugation은 각각의 세포가 밀도가 다른 점을 이용해서 원심분리 시 세포가 밀도별로 층층이 분리되는 원리를 이용한 방법이다. Pre-plating은 배양 시 세포가 부착하는 속도를 이용해서 초기 단계에 빠르게 부착하는 세포, 천천히 부착하는 세포 등 여러 분획으로 분리할 수 있는 방법이다(Gharaibeh et al., 2008). 두 방법은 특별한 장치를 필요하지 않고 많은 양의 세포 분리가 가능하기 때문에 이전부터 세포공학 분야에서 주로 사용된 방법이다. 하지

그림 2. 배양육 생산을 위한 공정 과정 (Melzener et al., 2022)

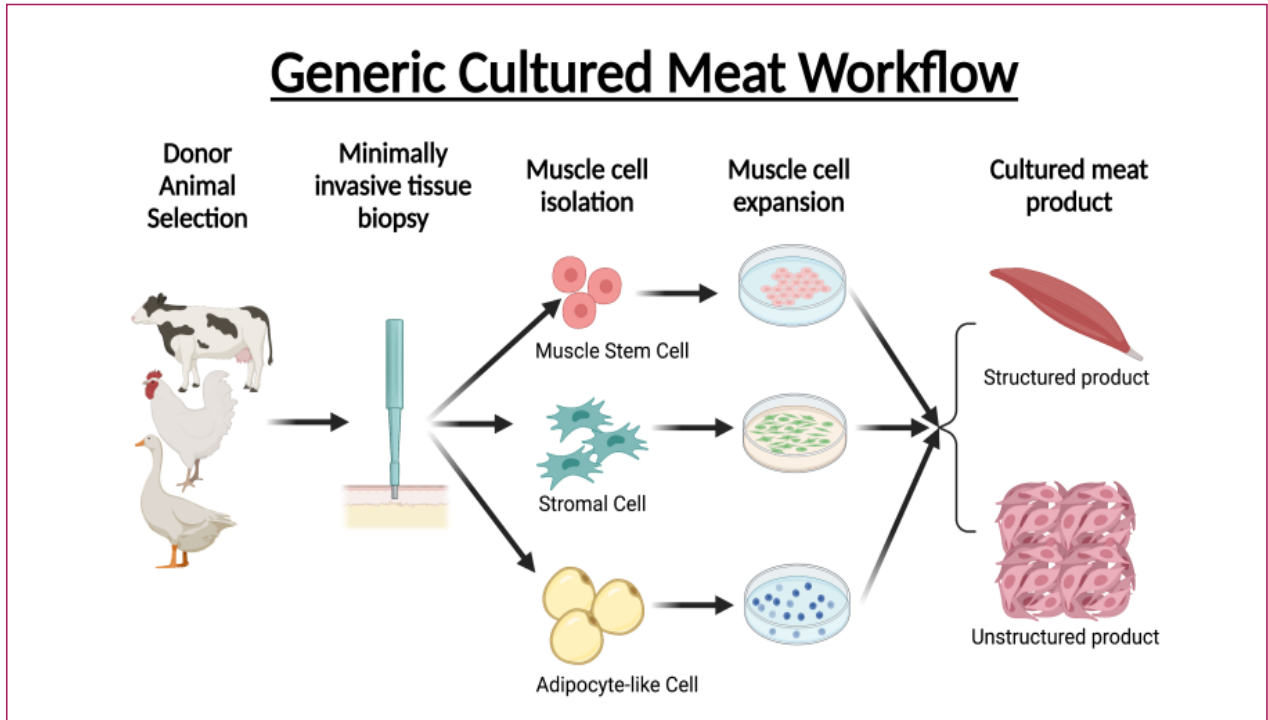
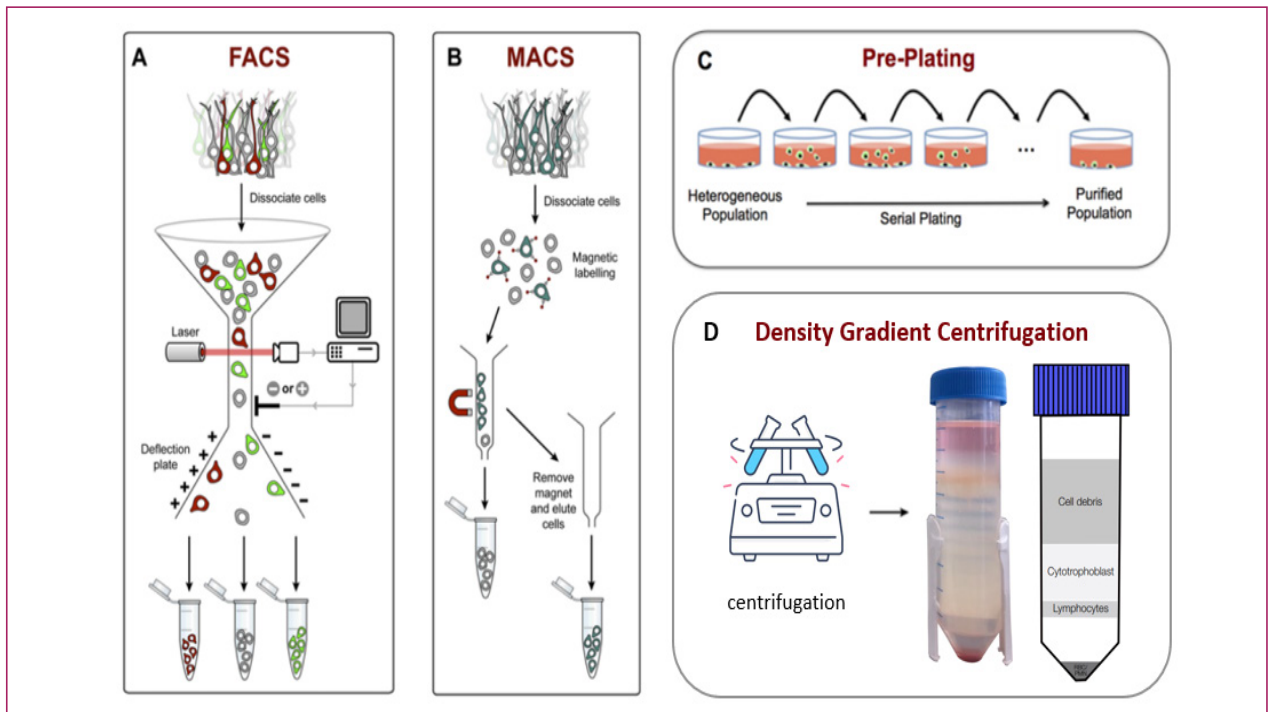


그림 3. 세포 분류 기술



(A): FACS: fluorescence-activated cell sorting (B): MACS: magnetic-activated cell sorting (C): pre-plating 및 (D): density gradient centrifugation (Pantelic and Larkin, 2018; ThermoScientific)

표 2. 세포 분리 방법의 장점과 단점(Zhu and Murthy, 2013)

Method	Advantage	Disadvantage
FACS (Fluorescence-activated cell sorting)	Powerful, high precision, high sensitivity, high resolution	Requires well-trained personal for operation, costly, requires a special apparatus, not for large-scale processing
MACS (Magnetic-activated cell sorting)	Simpler than FACS	Target stem cells contains magnetic particles
Pre-plating	Large processing quantity, easy scaling up, facile	Low purity, more heterogeneity output
Density gradient centrifugation	Large processing quantity, easy scaling up, facile	Low purity, more heterogeneity output

만 유사한 크기 및 밀도를 갖는 세포로 인한 분리의 순도 및 정확도의 편차가 크게 나타나는 단점이 있다 (Ding et al., 2017). 위의 한계를 극복하기 위해 항체를 사용하여 세포에 특정한 표면 마커를 라벨링하여 분리 방법이 개발되었다. FACS는 고순도의 세포 분리가 가능하지만, 고가의 장비가 필요하고 처리가능한 용량이 제한되어 있다. MACS는 FACS에 비해 간단한 준비 및 처리과정을 이용하지만, FACS에 비해 순도가 낮으며, 자성을 지닌 bead가 부착된 항체를 이용하여야 한다. 앞서 말한 4가지의 방법에는 장점과 단점이 공존하기에 목적에 따라 세포에 맞는 분리 방법을 택해야 한다. 더 나아가, 국내 가축의 적합한 세포 추출기법에 대한 연구가 미미한 실정이기 때문에 추가적인 연구가 필요하며, 세포배양육 생산 시 경제적인 관점도 크게 작용하기에 합리적인 분리 기술 또한 개발되어야 한다.

### 3. Primary Cells의 저장 및 관리(Cryopreservation and Maintenance)

분리 및 분류된 일차 세포는 세포 배양육 생산과정 전반에 걸쳐 세포 품질을 유지하는 것이 중요하다(Baquero-perez et al., 2012). 동결보존(Cryopreservation)은 배양육 생산을 위한 세포의 품질을 지속적으로 유지시킬 수 있는 기술이다. 세포를 동결보존할 때 중요한 점은 세포의 증식능력뿐만 아니라, 분화능력까지 손상없이 유지되는지의 여부이다(Hunt, 2011). 표 3과 같이 일차 세포의 동결

밀도는  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $11 \times 10^6$ 에서 높은 세포 회복력을 나타낸다. 동결 속도와 해동 온도에서는 큰 차이 없이 모든 처리군에서 높은 세포 회복력을 나타냈고, 부드러운 균질화 일차세포는 높은 회복력을 나타냈다(Young et al., 1991). 동결 및 해동에 따른 세포 손상이 우려되나, 해당 기술은 이미 정립되어 있으며, cell freezing medium 등 다양한 상용 제품이 개발되어 있다. 특히 DMSO는 효과적인 동결방지제이며, 세포 동결에 일반적으로 사용된다. 하지만 DMSO와 같은 물질들은 여러 연구를 통해 높은 농도에서 포유류 세포에 독성이 있다고 밝혀져 있다(Galvao et al., 2014; Hanslick et al., 2008; Vogin et al., 1970). 세포 치료에 사용하기 위한 세포를 동결 보존하는데 사용될 때 일부 심각한 부작용과 관련있다 (Grein et al., 2010). 그리고 글리세롤과 같은 다른 일반적인 동결방지제 또한 세포에 독성 영향을 미칠 수 있다(Armitage and Mazur, 1984). DMSO:Glycerol 비율은 5:0, 7.5:0, 10:0에서 동결한 일차세포는 높은 회복력을 나타냈다(Young et al., 1991). 이상적인 세포 배양육 생산을 위해서는 동결보존 시 사용되는 동해방지제 중 DMSO 또는 유사한 성분의 사용을 피해야 한다(Kakehi et al., 2023). 또한 trehalose 같이 일차세포 동결에서 DMSO의 독성을 완화해주는 첨가제를 사용할 수 있다(Odintsova et al., 2001). 인체에 무해하고 안전한 동해방지제 성분에 관한 연구와 가축의 일차세포를 동결 보존하는 방법을 확립이 필수적이며, 세포 배양육 생산 시 필요한 고품질의 세포를 지속적으로 공급할 수 있을 것으로 사료된다.

표 3. 세포동결 시 동결세포밀도, DMSO: glycerol 비율, 균질, 동결속도, 해동온도에 따른 일차세포의 회복력 (Young et al., 1991)

Parameters analyzed	Percent recovered (%)	Viability
<b>Cells/aliquot frozen</b>		
1 x 10 <sup>6</sup>	65.2	+++
5 x 10 <sup>6</sup>	56.7	+++
7 x 10 <sup>6</sup>	ND	ND
10 x 10 <sup>6</sup>	ND	ND
11 x 10 <sup>6</sup>	74.3	+++
<b>Cryopreservative</b>		
0D:0G	25.4	±
0D:1G	36.6	-
0D:5G	36.4	-
0D:10G	25.9	-
0D:15G	19.1	-
0D:20G	33.8	-
1D:0G	ND	ND
2.5D:0G	ND	ND
5D:0G	64.2	++
7.5D:0G	63.0	+++
7.5D:1G	49.9	-
7.5D:5G	51.3	-
7.5D:10G	39.6	-
7.5D:15G	33.2	-
7.5D:20G	35.9	-
10D:0G	61.9	++
10D:1G	32.0	-
10D:5G	22.7	-
10D:10G	24.6	-
10D:15G	24.3	-
10D:20G	16.5	-
<b>Equilibration</b>		
Vortex	36.5	++
Triturate	67.1	++
Gentle mix	93.9	+++
<b>Freezing time</b>		
Fast	63.0	+++
Slow	62.9	+++

표 3. 계속

Parameters analyzed	Percent recovered (%)	Viability
Thawing Temp.		
Hand warm	62.8	+++
37°C bath	63.0	+++

Percent recovery = [Number of trypan blue excluded cells/Theoretical number of cells frozen] x 100.

Viability assessed by the morphologic appearance.

ND = not determined.

D:G = ratio of percent DMSO:percent glycerol.

#### 4. Primary Cells를 이용한 세포 배양육 기업 및 제품

세포 배양육 시장이 크게 활성화되면서 다양한 세포주 및 세포 유형을 사용한 세포 배양육 개발이 진행되고 있다. 2020년 Good Food Institute가 보고한 자료에 따르면(그림 4), 골격근 줄기세포, 섬유아세포, 중간엽 줄기세포, 지방 유래 세포 등의 다양한 세포 중, 세포 배양육을 생산하는 기업의 61%는 3~4종, 34%는 1~2종의 세포를 사용한다. 또한 89%의 기업은 사용하는 세포의 유형을 1년 안에 추가할

계획이라고 밝혔다(그림 4).

필요한 세포를 획득하는 가장 일반적인 방법은 살아있는 동물로부터 일차세포를 채취하는 것이며, 기업은 육류(골격근, 지방 또는 결합조직)를 구성하는 세포를 주로 생산하지만, 경우에 따라 뼈나 연골, 심장 근육을 포함한 다양한 기타 조직도 생산한다. 이처럼 목적에 따라 다양한 세포를 이용하여 생산 및 개발된 세포 배양육으로 Hampton Creek 기업(현 Just)이 생산한 간세포에서 유래된 푸아그라(Guardian, 2018), Eat Just 기업에서 닭에서 추출한 세포를 배양해 만든 너겟, Avant Meats 기업에서 세포 배양으로 만든 어류의 부레(The Spoon, 2019)와 같은 기관 조직 등 다양한 제품들이 있다(그림 5).

그중, 캘리포니아 스타트업 기업인 Eat Just는 닭에서 추출한 세포를 배양해 만든 너겟을 싱가포르 식품청에 식품으로써 승인을 받고 세계 최초로 제품을 판매했다(CNBC, 2020). 추가적으로, 런던의 Primeval Foods는 기린, 코끼리, 사자, 호랑이와 같은 이국적인 동물의 세포를 추출하여 배양육을 생산하고, 규제 승인이 통과되면

그림 4. 세포 배양육 생산기업에서 사용하는 주요 세포 유형 및 12개월 내에 사용 예정인 세포 유형(Good Food Institute, n.d.)

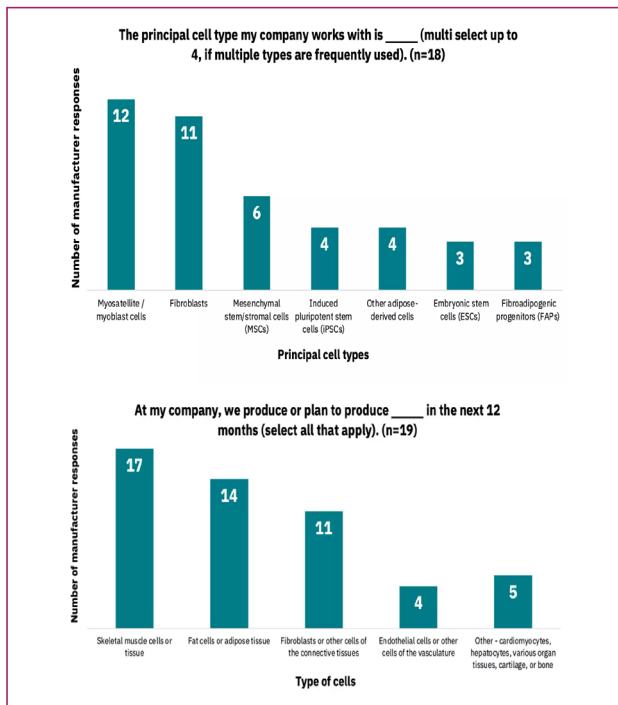


그림 5. 세포 배양육 생산 기업에서 개발 및 출시된 세포 배양육 제품





시식회를 개최할 계획이라고 밝혔다(Dailymail, 2022). 그리고, 포유류의 일차세포뿐만 아니라, 어류의 세포를 사용한 배양육 연구도 활발히 진행 중인데, Wildtype 기업은 식물 기반 스키펠드에 수정란에서 채취한 연어 세포를 배양하여 “Saku”라는 제품을 만들었다(Wildtype, n.d.).

이처럼 많은 세포배양육 기업들은 생산된 배양육이 규제 승인을 받고 육류 제품으로서 판매하기 위해 기존 육류의 성분과 특징을 모방하기 위해 노력하고 있으며, 더 나아가 맛(Joo et al., 2022), 질감(Paredes et al., 2022)과 같은 관능적인 부분과 영양적인 부분(Dohmen et al., 2022)까지 최근 연구가 진행되고 있다.

### III. 결론

세포추출 및 정제에 관한 선행연구는 대부분 의학 분야

에서 진행되었으며, 세포연구는 암세포주가 주로 이용되었다. 세포 배양육은 앞선 연구결과들을 기반으로 발전했기에, 이용되는 세포에 관한 기본적인 자료 및 기술은 방대하게 쌓여 있다. 하지만, 세포 배양육은 앞선 연구와 달리 식품으로 이용되기 때문에 위생적이고 인체에 안전할 수 있도록 개발이 진행되어야 한다. 이를 위해선 적절한 세포에 대해 치밀하고, 심도 깊은 연구가 필요할 것으로 사료된다. 또한 세포 배양육 세포 생산과 관리의 중요성이 강조되어야 한다. 현재까지 전 세계적으로 배양육용 세포에 관한 적절한 시선과 연구방법에 대해 무수히 논의되고 있다. 앞으로도 혁신적인 세포추출 및 정제 방법은 끊임없이 필요할 것이며, 발전할 것이다. 세포 배양육이 식품으로 발전하고 안정적으로 정착하기 위해 세포 배양육의 씨앗 원료인 세포에 대한 깊은 이해와 관심을 시작으로 세포 배양육 생산 공정의 모든 과정이 일차세포를 기반으로 폭 넓고, 정확한 이해가 필요할 것으로 사료된다.

### 참고문헌

1. Armitage WJ, Mazur P. (1984). Toxic and osmotic effects of glycerol on human granulocytes. *American Journal of Physiology–Cell Physiology*, 247(5), C382–C389.
2. Arrizabalaga JH, Nollert MU. (2017). Properties of porcine adipose-derived stem cells and their applications in preclinical models. *Adipocyte*, 6(3), 217–223. <https://doi.org/10.1080/21623945.2017.1312040>
3. Baquero-Perez B, Kuchipudi SV, Nelli RK, Chang KC. (2012). A simplified but robust method for the isolation of avian and mammalian muscle satellite cells. *Bmc Cell Biology*, 13. <https://doi.org/Artn1610.1186/1471-2121-13-16>
4. Chakravarthy MV, Davis BS, Booth FW. (2000). IGF-I restores satellite cell proliferative potential in immobilized old skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985), 89(4), 1365–1379. <https://doi.org/10.1152/jappl.2000.89.4.1365>
5. Choi KH, Yoon JW, Kim M, Lee HJ, Jeong J, Ryu M, Jo C, Lee CK. (2021). Muscle stem cell isolation and *in vitro* culture for meat production: A methodological review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(1), 429–457. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12661>
6. Church CD, Berry R, Rodeheffer MS. (2014). Isolation and study of adipocyte precursors. *Methods of Adipose Tissue Biology*, Pt A, 537, 31–46. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411619-1.00003-3>
7. CNBC. (2020). Singapore issues first regulatory approval for lab-grown meat to Eat Just. Retrieved from

<https://www.cnn.com/2020/12/01/singapore-issues-first-regulatory-approval-for-lab-grown-meat-to-eat-just.html>

8. Dailymail. (2022). Lab-grown lion burgers, tiger steaks and zebra sushi rolls could soon be on the menu in Britain after start-up reveals plans for 'cultivated' exotic meat products. Retrieved from <https://www.dailymail.co.uk/sciencetech/article-10710861/Lab-grown-exotic-meat-tiger-steaks-lion-burgers-soon-British-dinner-tables.html>
9. Danoviz ME, Yablonka-Reuveni Z. (2012). Skeletal muscle satellite cells: background and methods for isolation and analysis in a primary culture system. *Methods Mol Biol*, 798, 21-52. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-343-1\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-343-1_2)
10. Day K, Shefer G, Shearer A, Yablonka-Reuveni Z. (2010). The depletion of skeletal muscle satellite cells with age is concomitant with reduced capacity of single progenitors to produce reserve progeny. *Developmental Biology*, 340(2), 330-343.
11. Ding S, Wang F, Liu Y, Li S, Zhou G, Hu P. (2017). Characterization and isolation of highly purified porcine satellite cells. *Cell Death Discov*, 3, 17003. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2017.3>
12. Ding SJ, Swennen GNM, Messmer T, Gagliardi M, Molin DGM, Li CB, Zhou GH, Post MJ. (2018). Maintaining bovine satellite cells stemness through p38 pathway. *Scientific Reports*, 8. <https://doi.org/ARTN1080810.1038/s41598-018-28746-7>
13. Dohmen RG, Hubalek S, Melke J, Messmer T, Cantoni F, Mei A, ... , Flack JE. (2022). Muscle-derived fibro-adipogenic progenitor cells for production of cultured bovine adipose tissue. *npj Science of Food*, 6(1), 6. <https://doi.org/10.1038/s41538-021-00122-2>
14. Fauconneau F, Paboeuf G. (2000). Effect of fasting and refeeding on *in vitro* muscle cell proliferation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cell and Tissue Research*, 301(3), 459-463. <https://doi.org/DOI10.1007/s004419900168>
15. Galvao J, Davis B, Tilley M, Normando E, Duchon MR, Cordeiro MF. (2014). Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *Faseb Journal*, 28(3), 1317-1330. <https://doi.org/10.1096/fj.13-235440>
16. Gharaibeh B, Lu A, Tebbets J, Zheng B, Feduska J, Crisan M, Peault B, Cummins J, Huard J. (2008). Isolation of a slowly adhering cell fraction containing stem cells from murine skeletal muscle by the preplate technique. *Nat Protoc*, 3(9), 1501-1509. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.142>
17. Gibson MC, Schultz E. (1983). Age-related differences in absolute numbers of skeletal muscle satellite cells. *Muscle Nerve*, 6(8), 574-580. <https://doi.org/10.1002/mus.880060807>
18. Good Food Institute. (n.d.). Cell line and types. Retrieved from <https://gfi.org/resource/cultivated-meat-media-growth-factor-survey/#cell-lines-and-types>
19. Grein TA, Freimark D, Weber C, Hudel K, Wallrapp C, Czermak P. (2010). Alternatives to dimethylsulfoxide for serum-free cryopreservation of human mesenchymal stem cells. *The International Journal of Artificial Organs*, 33(6), 370-380.
20. The Guardian. (2018). Lab-made meat could be the next food revolution: here's what it tastes like. Retrieved

from <https://www.theguardian.com/lifeandstyle/2018/jan/31/eat-it-without-the-guilt-the-story-of-the-worlds-first-clean-foie-gras>

21. Hanslick JL, Lau K, Noguchi KK, Olney JW, Zorumski CF, Mennerick S, Farber NB. (2009). Dimethyl sulfoxide (DMSO) produces widespread apoptosis in the developing central nervous system. *Neurobiology of Disease*, 34(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.11.006>
22. Hindi L, McMillan JD, Afroze D, Hindi SM, Kumar A. (2017). Isolation, culturing, and differentiation of primary myoblasts from skeletal muscle of adult mice. *Bio Protoc*, 7(9). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2248>
23. Hunt CJ. (2011). Cryopreservation of human stem cells for clinical application: A review. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 38(2), 107–123. <https://doi.org/10.1159/000326623>
24. Joo ST, Choi JS, Hur SJ, Kim GD, Kim CJ, Lee EY, ... , Hwang YH. (2022). A comparative study on the taste characteristics of satellite cell cultured meat derived from chicken and cattle muscles. *Food Science of Animal Resources*, 42(1), 175. <https://doi.org/10.5851/2Fkosfa.2021.e72>
25. Kakehi R, Yoshida A, Takahashi H, Shimizu T. (2023). Repeated and long-term cryopreservation of primary bovine myogenic cells to maintain quality in biomimetic cultured meat. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 7. <https://doi.org/ARTN102305710.3389/fsufs.2023.1023057>
26. Kuang SH, Kuroda K, Le Grand F, Rudnicki MA. (2007). Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell*, 129(5), 999–1010. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.044>
27. Li DD, Zhan SY, Wang YL, Wang LJ, Zhong T, Li L, Fan JS, Xiong CR, Wang Y, Zhang HP. (2015). Role of microRNA-101a in the regulation of goat skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation. *Gene*, 572(2), 198–204. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.07.010>
28. Machida S, Spangenburg EE, Booth FW. (2004). Primary rat muscle progenitor cells have decreased proliferation and myotube formation during passages. *Cell Proliferation*, 37(4), 267–277. <https://doi.org/DOI10.1111/j.1365-2184.2004.00311.x>
29. Melzener L, Ding S, Hueber R, Messmer T, Zhou G, Post MJ, Flack JE. (2022). Comparative analysis of cattle breeds as satellite cells donors for cultured beef. *bioRxiv*, 2022.2001. 2014.476358.
30. Mesires NT, Doumit ME. (2002). Satellite cell proliferation and differentiation during postnatal growth of porcine skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 282(4), C899–C906. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00341.2001>
31. Messmer T, Dohmen RG, Schaeken L, Melzener L, Hueber R, Godec M, Post MJ, Flack JE. (2022). Single-cell analysis of bovine muscle-derived cell types for cultured meat production. *bioRxiv*, 2022.2009. 2002.506369.
32. Miersch C, Stange K, Rontgen M. (2018). Separation of functionally divergent muscle precursor cell populations from porcine juvenile muscles by discontinuous Percoll density gradient centrifugation. *Bmc Cell Biology*, 19. <https://doi.org/ARTN210.1186/s12860-018-0156-1>
33. Motohashi N, Asakura Y, Asakura A. (2014). Isolation, culture, and transplantation of muscle satellite cells. *Jove-Journal of Visualized Experiments*(86). <https://doi.org/ARTNe5084610.3791/50846>
34. Musaro A, Carosio S. (2017). Isolation and culture of satellite cells from mouse skeletal muscle. *Methods Mol*

- Biol, 1553, 155–167. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6756-8\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6756-8_12)
35. Nawi IM, Pinguan–Murphy B. (2009). Optimisation of isolation protocol of local bovine articular chondrocytes. 2009 International Conference for Technical Postgraduates (TECHPOS),
  36. Odintsova N, Kiselev K, Sanina N, Kostetsky E. (2001). Cryopreservation of primary cell cultures of marine invertebrates. *Cryo–Letters*, 22(5), 299–310.
  37. Oecd FAO. (2022). OECD–FAO Agricultural Outlook 2022–2031.
  38. Pantelic MN, Larkin LM. (2018). Stem cells for skeletal muscle tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev*, 24(5), 373–391. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2017.0451>
  39. Paredes J, Cortizo–Lacalle D, Imaz AM, Aldazabal J, Vila M. (2022). Application of texture analysis methods for the characterization of cultured meat. *Scientific Reports*, 12(1), 3898. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07785-1>
  40. Park S, Gagliardi M, Swennen G, Dogan A, Kim Y, Park Y, Park G, Oh S, Post M, Choi J. (2022). Effects of hypoxia on proliferation and differentiation in Belgian Blue and Hanwoo muscle satellite cells for the development of cultured meat. *Biomolecules*, 12(6). <https://doi.org/ARTN83810.3390/biom12060838>
  41. Rada T, Gomes ME, Reis RL. (2011). A novel method for the isolation of subpopulations of rat adipose stem cells with different proliferation and osteogenic differentiation potentials. *J Tissue Eng Regen Med*, 5(8), 655–664. <https://doi.org/10.1002/term.364>
  42. Redshaw Z, McOrist S, Loughna P. (2010). Muscle origin of porcine satellite cells affects *in vitro* differentiation potential. *Cell Biochem Funct*, 28(5), 403–411. <https://doi.org/10.1002/cbf.1670>
  43. Rodbell M. (1964). Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J Biol Chem*, 239, 375–380. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14169133>
  44. Rojewski MT, Weber BM, Schrezenmeier H. (2008). Phenotypic characterization of mesenchymal stem cells from various tissues. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 35(3), 168–184. <https://doi.org/10.1159/000129013>
  45. Rosen ED, Spiegelman BM. (2014). What we talk about when we talk about fat. *Cell*, 156(1–2), 20–44. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.012>
  46. Saad MK, Yuen JSK Jr, Joyce CM, Li X, Lim T, Wolfson TL, Wu J, Laird J, Vissapragada S, Calkins OP, Ali A, Kaplan DL. (2023). Continuous fish muscle cell line with capacity for myogenic and adipogenic–like phenotypes. *Sci Rep*, 13(1), 5098. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31822-2>
  47. Sadkowski T, Ciecierska A, Oprzadek J, Balcerek E. (2018). Breed–dependent microRNA expression in the primary culture of skeletal muscle cells subjected to myogenic differentiation. *Bmc Genomics*, 19. <https://doi.org/ARTN10910.1186/s12864-018-4492-5>
  48. Sui M, Zheng Q, Wu H, Ding J, Liu Y, Li W, Chu M, Zhang Z, Ling Y. (2018). Isolation, culture and myogenic differentiation of muscle stem cells in goat fetal. *Scientia Agricultura Sinica*, 51(8), 1590–1597.
  49. TEDx Talk. 2013. <https://www.youtube.com/watch?v=ZExbQ8dkJvc>
  50. The Spoon. (2019). Avant meats develops cultured seafood (Fish maw, sea cucumber) for a Chinese audience.

Retrieved from <https://thespoon.tech/avant-meats-develops-cultured-seafood-fish-maw-sea-cucumber-for-a-chinese-audience/>

51. Urbani L, Piccoli M, Franzin C, Pozzobon M, De Coppi P. (2012). Hypoxia increases mouse satellite cell clone proliferation maintaining both *in vitro* and *in vivo* heterogeneity and myogenic potential. Plos One, 7(11). <https://doi.org/ARTNe4986010.1371/journal.pone.0049860>
52. Vogin EE, Carson S, Cannon G, Linegar CR, Rubin LF. (1970). Chronic toxicity of DmsO in primates. Toxicology and Applied Pharmacology, 16(3), 606-&. [https://doi.org/Doi10.1016/0041-008x\(70\)90065-7](https://doi.org/Doi10.1016/0041-008x(70)90065-7)
53. Wang Y, Xiao X, Wang LJ. (2020). *In vitro* characterization of goat skeletal muscle satellite cells. Animal Biotechnology, 31(2), 115-121. <https://doi.org/10.1080/10495398.2018.1551230>
54. Wilson A, Chee M, Butler P, Boyd AS. (2019). Isolation and characterisation of human adipose-derived stem cells. Methods Mol Biol, 1899, 3-13. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8938-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8938-6_1)
55. Worldometer (2023) <https://www.worldometers.info/world-population/>
56. Xu X, Dai H, Wang C. (2016). Epithelium-dependent profibrotic milieu in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis: current status and future directions. Clin Respir J, 10(2), 133-141. <https://doi.org/10.1111/crj.12190>
57. Yablonkareuveni Z, Anderson SK, Bowenpope DF, Nameroff M. (1988). Biochemical and morphological differences between fibroblasts and myoblasts from embryonic chicken skeletal-muscle. Cell and Tissue Research, 252(2), 339-348. <Go to ISI>://WOS:A1988M857600013
58. Yablonkareuveni Z, Quinn LS, Nameroff M. (1987). Isolation and clonal analysis of satellite cells from chicken *pectoralis*-muscle. Developmental Biology, 119(1), 252-259. [https://doi.org/Doi10.1016/0012-1606\(87\)90226-0](https://doi.org/Doi10.1016/0012-1606(87)90226-0)
59. Yamamoto M, Nakata H, Hao J, Chou J, Kasugai S, Kuroda S. (2014). Osteogenic potential of mouse adipose-derived stem cells sorted for CD90 and CD105 *in vitro*. Stem Cells Int, 2014, 576358. <https://doi.org/10.1155/2014/576358>
60. Ye YL, Zhou JW, Guan X, Sun XL. (2022). Commercialization of cultured meat products: Current status, challenges, and strategic prospects. Future Foods, 6. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2022.100177>
61. Young HE, Morrison DC, Martin JD, Lucas PA. (1991). Cryopreservation of embryonic chick myogenic lineage-committed stem cells. Journal of Tissue Culture Methods, 13, 275-283.
62. Zhu B, Murthy SK. (2013). Stem cell separation technologies. Curr Opin Chem Eng, 2(1), 3-7. <https://doi.org/10.1016/j.coche.2012.11.002>