



## Carne artificiale, salute e ambiente: cosa sappiamo e cosa non sappiamo.

Giuseppe Pulina, professore ordinario di Etica e Sostenibilità degli Allevamenti.

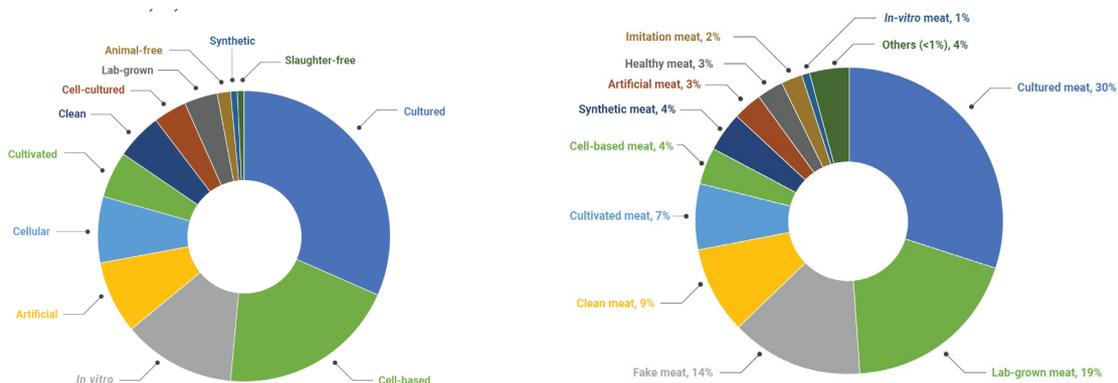
### 1. Premessa.

Quanto riportato in questa sede è frutto dell'analisi della bibliografia più recente, in forma prevalentemente di *review* o di relazioni ufficiali di Autorità competenti, nella consapevolezza che l'interesse scientifico per questo argomento ha subito negli ultimi anni un progresso esponenziale, come dimostrato dagli allegati diagrammi esprimenti il numero di pubblicazioni estratte da Scopus® con l'impiego delle parole chiave "cultivated or cellular or artificial and meat", tale da rendere difficile raggiungere la completa esaustività.

### 2. Aspetti lessicali

Gli aspetti terminologici sono stati esplorati da diversi Autori e riassunti nel report FAO-WHO (2023) da cui risulta che sono state impiegate 23 diverse denominazioni per questo tipo di prodotti, con le frequenze riportate nella figura 1.

Figura 1 – Frequenza dei diversi termini impiegati per definire la carne prodotta con bioreattori in ambito accademico, a sinistra, e nei media, a destra (FAO-WHO, 2023)



Il report, dopo attenta analisi, conclude che *“To make the terminology non-commodity-specific, ‘cell-based’ may be useful as in cell-based food, cell-based food products, or cell-based food production, while ‘cultivated’ and ‘cultured’ most likely need to be followed by a commodity name, such as meat, chicken, fish and so forth.”*.

In questa sede, parlando di carni, si preferisce utilizzare l’aggettivo **“artificiale”** in quanto la carne naturale, (come tutti i cibi) è costituita da cellule e la loro coltivazione avviene con processi naturali all’interno degli animali che alleviamo, alimentiamo e curiamo per questo scopo. L’espianto di queste cellule e la loro messa in coltura extracorporea è un processo totalmente artificiale.

### **3. Come funzionano le domande fatte alla scienza: il principio di precauzione.**

Nella scienza ci sono cose che sappiamo di sapere bene, altre che sappiamo di conoscere approssimativamente, altre che sappiamo di non conoscere e, infine, ne esistono moltissime che non sappiamo di non conoscere. Negli ultimi tre casi (il terzo è incluso solo per via ipotetica), se vi sono in gioco salute umana, sicurezza personale e ambientale, è ragionevole adottare il cosiddetto “principio di precauzione” che previene il verificarsi di danni nella situazione di incertezza circa il rischio o, addirittura, l’ignoranza di possibili eventi avversi.

Inoltre, poiché **non sapere se un evento** (nel caso in specie, l’ingestione di cibi artificiali) **è nocivo non equivale a sapere che lo stesso non è nocivo**, il superamento del principio di precauzione pretende logicamente che si producano prove positive sull’innocuità del fenomeno indagato, mentre *non* sono valide prove mancanti sulla sua eventuale nocività. In altre parole, se vi è un potenziale pericolo (evento nocivo) di cui non conosciamo il rischio (frequenza degli esiti negativi conseguenti all’esposizione allo stesso), è meglio tenerlo sotto controllo fino all’accumulo di evidenze maggiori sia sulla natura del rischio che sui suoi effetti in una popolazione esposta. L’enunciazione dei pericoli potenziali, prima fase della procedura di analisi e gestione del rischio, in assenza di dati robusti circa la sua incidenza nella popolazione esposta, comporta automaticamente l’assunzione del principio di precauzione e l’onere della prova volta a dimostrare l’innocuità del fenomeno, o la sua irrilevanza data la bassa incidenza, è a carico di chi propone un prodotto o un processo potenzialmente dannoso per i cittadini e per l’ambiente. *“A proactive approach employs the development of adequate evidence to assess risk and demonstrate safety in advance of commercialization. Safety testing, in particular, plays a critical role in development of safe product, regulatory authorization and guaranteeing that statements made to investors and the public are based on sound evidence” (Ong et al., 2021).*

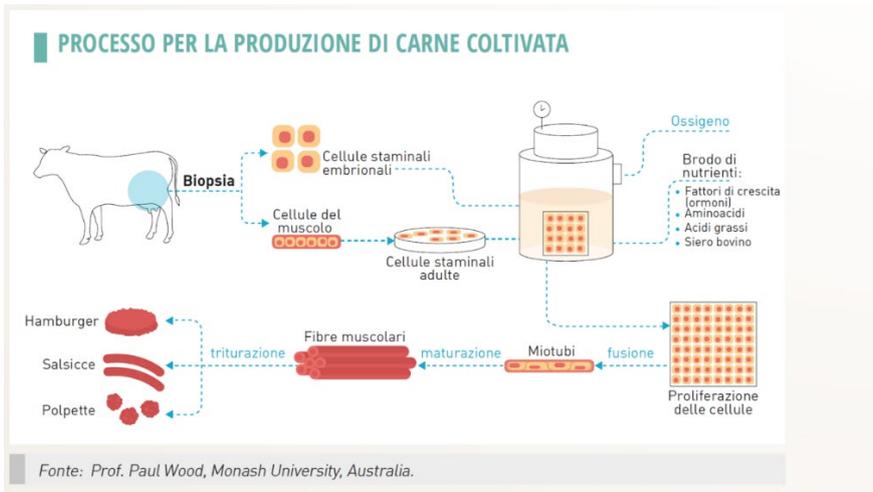
### **4. Cosa conosciamo sul processo di produzione della carne artificiale**

#### *4.1 Il processo di produzione*

In estrema sintesi (FAO-WHO, 2023), le cellule utilizzate per la produzione di alimenti a base cellulare possono essere cellule staminali embrionali, che sono cellule pluripotenti che si trovano all’interno di blastocisti e hanno una capacità illimitata di auto-rinnovamento e la capacità di differenziarsi in qualsiasi tipo di cellula somatica, cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) che derivano da cellule somatiche adulte riprogrammate e che hanno riacquisito la capacità di differenziarsi in qualsiasi tipo di cellula presente nell’organismo, cellule staminali mesenchimali o cellule staminali adulte quali cellule miosatelliti. La rappresentazione schematica del processo di produzione di carne artificiale è illustrata nella figura 2.

Il processo industriale di produzione della carne artificiale deriva dal *up-scaling* delle ricerche sviluppate per la coltura di tessuti cellulari a scopo medico-farmaceutico e di ricerca di base. La review più completa sullo stato dell’arte della carne artificiale, pubblicata da Choi et al. (2021), richiama la complessità del processo che è a tutti gli effetti una simulazione su larga scala di ciò che avviene naturalmente in un muscolo che subisce una ferita e che, grazie alla riserva staminale, è in grado di riparare (parzialmente) l’ingiuria.

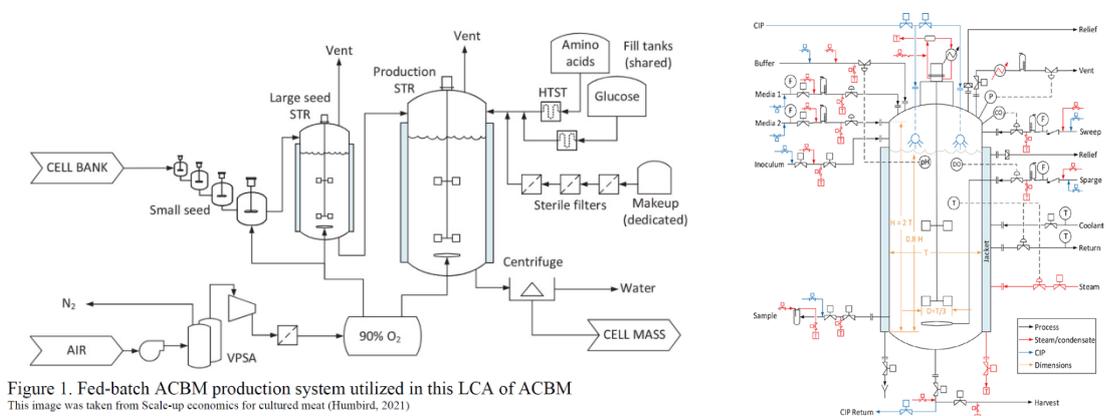
Figura 2 – Processo schematico di produzione di carne artificiale (Bernardi, Capri, Pulina, 2023)



Nel processo si parte da una biopsia di muscolo di un animale (e di tessuti adiposo, connettivo e vascolare nel caso siano presenti linee separate di produzione di questi tessuti da integrare con quello muscolare alla fine del processo per rendere il prodotto più simile alla carne naturale), separazione con vari metodi delle cellule staminali muscolari ottenute per digestione enzimatica dalle altre cellule (stroma, soma, sangue, ecc) presenti nel supernatante, crioconservazione, proliferazione delle cellule indifferenziate su substrati nutritivi ricchi di biomediatori (con soppressione della tendenza di queste cellule alla differenziazione in mioblasti) in incubatori con parametri di pH, areobiosi e temperatura controllati, utilizzazione di scaffold (supporti che mimano la matrice extracellulare ECM [fibronectina, collagene, laminina] su cui si annidano le cellule e indispensabili per la loro proliferazione), riduzione dei fattori di proliferazione per attivare la differenziazione spontanea miogenica, formazione dei mioblasti che si fondono in miotubuli i quali, per accrescimento dimensionale (ipertrofia) danno origine al muscolo maturo (biologicamente, al tessuto muscolare risarcitorio del danno).

Il design del processo industriale impiegato e lo schema di bioreattore maggiormente in uso, sono ripostati in figura 3 (Humbrid, 2021).

Figura 3- Schema di processo e particolare del bioreattore impiegati nella produzione di carne artificiale (Humbrid, 2021).



## 4.2 I substrati utilizzati

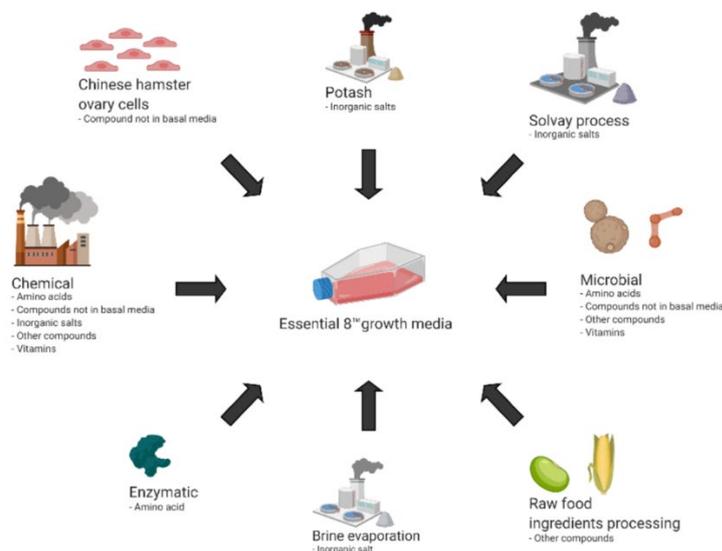
I substrati per la proliferazione cellulare utilizzati, e che consentono il miglior rendimento, contengono siero prelevato dal feto dopo la macellazione di vacche e cavalle gravide (20% e 10% in concentrazione rispettivamente), molecole segnale (di natura paracrina e ormonale) ed eventualmente antimicotici e antibiotici. Sommariamente, Choi et al. (2021) riportano sia necessario che il substrato contenga segnalatori cellulari (citochine, ormoni e inibitori di segnale), FGF2 (fattore di crescita dei fibroblasti 2), inibitori del segnale P38 (che svolge un ruolo cruciale nella differenziazione e proliferazione delle cellule staminali), gli ormoni insulina e IGFs (fattore di crescita insulino-simile), desametasone (glucocorticoide sintetico con funzioni anti-infiammatorie e immunosoppressive), betaTGF (fattore della trasformazione di accrescimento che previene la differenziazione cellulare), interleuchine e citochine infiammatorie, altri fattori paracrini fra i quali il fattore di crescita degli epatociti (HGF). Oltre a questo, i substrati devono contenere i vari nutrienti, fra cui aminoacidi essenziali e non essenziali, L-glutammina, antiossidanti (es. glutazione) e sostanza tampone (ed eventualmente antischiomogeni per prevenirne la formazione).

In alternativa all'impiego dei substrati contenenti sieri fetali, possono essere utilizzati *media* di proliferazione artificiali quali l'Essential8 (E8®) oppure Beefly-9, contenenti fattori di crescita derivanti da batteri, lieviti o alghe geneticamente modificati. E8® è in gran parte composto da Dulbecco's Modified Eagle Medium/Hams' F12 (DMEM/F12) terreno di base, ampiamente utilizzato per la coltura di cellule animali, insieme ad altri 7 ingredienti, tra cui: acido 2-fosfo-L-ascorbico sale trisodico, insulina, transferrina, selenito di sodio, fattore di crescita dei fibroblasti-2 (FGF-2), fattore di crescita trasformante beta (TGF-β) e altri ingredienti, fra cui bicarbonato di sodio. Beefly-9 (B9) ha per base sempre il DMEM/F12 e contiene gli stessi componenti del E8® con l'aggiunta di neuregulina, acqua ultrapura, antibiotici/antimicotici e albumina ricombinante (Stout et al., 2022). Tuttavia, Choi et al. (2021), hanno osservato che i *"serum free media still have lower effect on myoblast in vivo expansion compared with those of serum-containing media, indicating that muscle stem cell culture serum replacement remains to be solved"*.

Relativamente al processo di produzione dei substrati sostitutivi, la figura 4 riporta la complessità dello stesso e costituisce la base su cui gli autori (Risner et al., 2023) hanno costruito la LCA per gli impatti ambientali di queste basi colturali, dato che utilizzeremo in seguito.

*Figura 4 – Processo industriale per la generazione di substrati sostitutivi ai sieri (E8® e Beefly-9) per la produzione di carne artificiale (Risner et al., 2023).*

Figure 1.0 Broad production categories for E8/B9 components



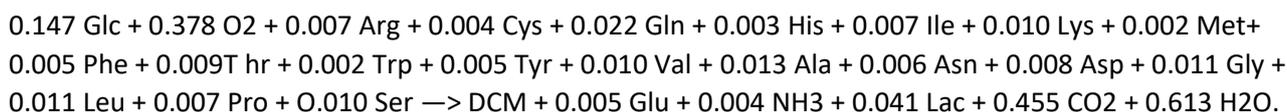
Alle attuali condizioni, alle quali si accennerà successivamente, occorrono circa 1,4 kL di questo medium per produrre 1 kg di carne artificiale; con uno *scaling up* dei bioreattori fino a 20kL, ne occorrerebbero circa 300 L per kg di prodotto.

Per quanto attiene, infine, all'impiego di antibiotici e antimicotici, Choi et al. (2021) hanno trovato che su 59 trials, 17 (il 29%) non hanno utilizzato queste molecole, mentre i restanti 42 (72%) li hanno impiegati (in particolare, penicillina, streptomina, gentamicina).

#### 4.3 Il consumo di fattori nutritivi e il bilancio materiale

Per definire il consumo di risorse necessarie per la produzione della carne artificiale, si deve partire dal bilancio stechiometrico. L'equazione per determinare le quantità (mol) di ossigeno, glucosio e AA necessari per la produzione di 1 mol di DCM (*dry cellular matter*) è stata sviluppata da Guamp e Kemp (1999) ed è riportata di seguito:

*Equazione 1: Moli di substrati necessari per la produzione di una mole di carne artificiale disidratata (Guamp e Kemp, 1999)*



Lo sviluppo di questa equazione ha reso possibile calcolare la quantità di substrati necessari per la produzione di 1 kg di carne artificiale (al 70% di umidità) come riportato nella tabella 1.

*Tabella 1 – Bilancio di massa per la produzione di 1 kg di carne sintetica con umidità al 70% (Correddu e Pulina su equazione di Guamp e Kemp, 1999).*

Substrati					Prodotto e Cataboliti				
molecola	P.M. (g/mol)	coeff reaz.	peso (g)	per kg Wet CM (kg)	molecola	P.M. (g/mol)	coeff reaz.	peso (g)	per kg Wet CM (kg)
glucosio	180,156	0,147	26,48	0,351	Dry CM	22,64	1,000	22,64	0,300
O2	31,998	0,378	12,10	0,160	Glu	147,1	0,005	0,74	0,010
Arg	174,203	0,007	1,22	0,016	NH3	17,0	0,004	0,07	0,001
cys	121,154	0,004	0,48	0,006	Lactate	89,1	0,041	3,65	0,048
Gln	146,146	0,022	3,22	0,043	CO2	44,0	0,455	20,02	0,265
His	155,156	0,003	0,47	0,006	H2O	18,0	0,613	11,04	0,146
Ile	131,175	0,007	0,92	0,012	<b>TOTALE</b>			<b>58,16</b>	<b>0,771</b>
Lys	146,189	0,010	1,46	0,019					
met	149,208	0,002	0,30	0,004					
Phe	165,192	0,005	0,83	0,011					
Tht	119,119	0,009	1,07	0,014					
Trp	204,228	0,002	0,41	0,005					
tyr	181,191	0,005	0,91	0,012					
Val	117,148	0,010	1,17	0,016					
Ala	89,094	0,013	1,16	0,015					
Asn	132,119	0,006	0,79	0,011					
Asp	133,104	0,008	1,06	0,014					
Gly	75,067	0,011	0,83	0,011					
Leu	131,175	0,011	1,44	0,019					
Pro	115,132	0,007	0,81	0,011					
Ser	105,093	0,010	1,05	0,014					
<b>TOTALE</b>			<b>58,17</b>	<b>0,771</b>					

Il calcolo dice che per produrre 1 t di carne artificiale fresca occorrono 771 kg di substrati (e 700 kg di acqua non computata nel bilancio) e che i residui metabolici assommano a 10 kg di glucosio, 1 kg di ammoniaca, 48 kg di lattato, 265 kg di anidride carbonica e 146 kg di acqua; eccetto l'ultima, tutti gli altri devono essere efficientemente rimossi dal medium produttivo, pena la morte della biomassa in accrescimento.

#### 4.4. L'up scaling e la produttività

L'ingegnerizzazione integrale del processo industriale di produzione di carne artificiale è riportata integralmente da Pajcin et al. (2022). Gursel et al. (2022) ritengono che il massimo *scaling up* raggiungibile con le tecnologie attuali comporti la costruzione di reattori con capacità massima di 20 kL in grado di produrre, con 4 passaggi di 11 giorni ciascuno, 3 t di biomassa fresca. In sostanza, l'intero ciclo (inizio proliferazione- raccolta biomassa cellulare) durerebbe 40 giorni, per cui, tolti i periodi *full-wide* per le necessarie sanitizzazioni, potrebbero essere svolti per anno un massimo di 10 cicli per bioreattore con una produzione teorica totale di 300 t di biomassa cellulare.

#### 4.5 Gli impatti ambientali: le emissioni di gas climalteranti

L'impatto climalterante della carne artificiale è stato oggetto di revisione da parte di Gursel et al. (2022) i quali si sono basati sulla letteratura più recente che ha effettuato tale valutazione con l'impiego della LCA (*Life Cycle Assessment*). Gli studiosi hanno concluso che il valore più attendibile varia da 13,6 kg di CO<sub>2</sub>e in caso di utilizzo di energia convenzionale, a 2,5 kg di CO<sub>2</sub>e in caso di utilizzo di energie rinnovabili, per kg di prodotto artificiale, come riportato nella figura 5. Gli autori ritengono le ultime due stime, che sono state poste in evidenza nella figura, le più attendibili in quanto comprendono le spese energetiche per il raffreddamento dei bioreattori che gli studi precedenti non avevano considerato.

Figura 5 – Impatto climalterante delle LCA rinvenute in letteratura per la carne artificiale (Gursel et al., 2022)

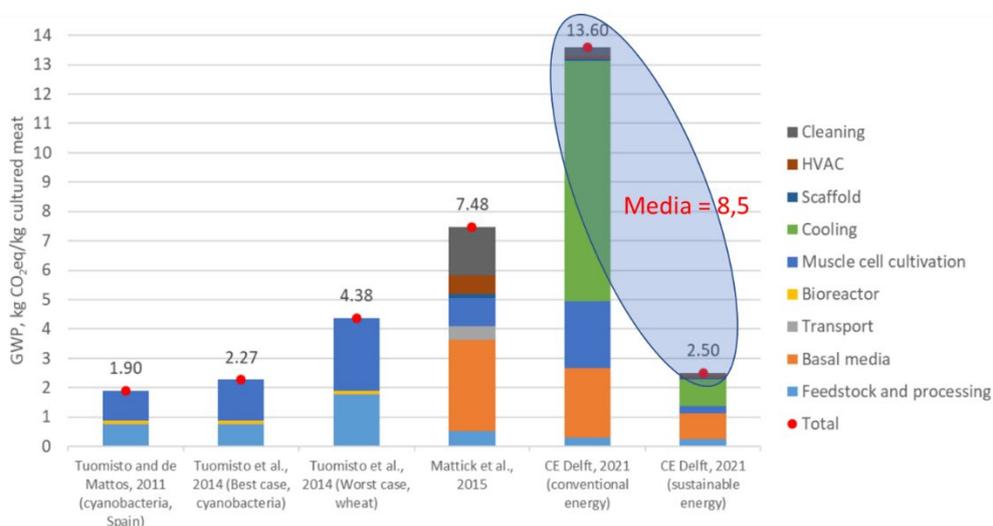


Figure 2 Global warming potential (GWP) of cultured meat

Tenuto conto che le stime dell'OECD-FAO (2021) concordano nel ritenere che da oggi al 2030 il consumo planetario di carne aumenterà del 14%, pari a 44 milioni di tonnellate (Mt) arrivando a 373 Mt, se questa domanda aggiuntiva venisse soddisfatta esclusivamente con la produzione di carne artificiale (nell'ipotesi cioè di bloccare la produzione di carne naturale ai 329 Mt ottenuti nel 2021), sarebbe necessario costruire 146.667 bioreattori da 20 kL della capacità di 3 t di prodotto/ciclo per 10 cicli/anno. In altre parole, dovrebbero essere installati circa 16.300 nuovi bioreattori all'anno solo per dare conto della maggiore richiesta di carne a livello planetario. Si consideri ora la composizione di questa domanda aggiuntiva che,

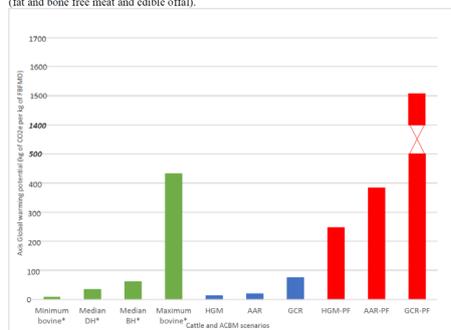
dalle proiezioni OCSE-FAO (2021) risulta costituita principalmente da carni avicole (+18%), che rappresenteranno nel 2030 il 41% delle proteine di origine carnea consumate nel mondo, seguita da quella suina (+13%, con il 34% delle proteine da carne) e infine bovine (+6%, con il 20% delle proteine consumate), mentre ovini e caprini rappresenteranno solo il 5% delle proteine consumate fra 7 anni (anche se cresceranno nel periodo del 15%). Assunto che le stesse proiezioni OCSE-FAO (2021) stimano un aumento delle emissioni climalteranti del settore zootecnico mondiale del 5% su base 2021, pari a 150 Mt di CO<sub>2</sub>e, nell'ipotesi che la carne sintetica possa essere prodotta al 50% con energia rinnovabile (valore molto generoso, visto il mix attuale di fonti utilizzate per produrre KWh a livello mondiale in cui le rinnovabili ammontano a meno del 15%), il dato che risulta è di 8 kg di CO<sub>2</sub>e per kg di prodotto per cui l'impatto complessivo per i 44 Mt di carne da produrre in più sarà di 352 Mt di CO<sub>2</sub>e. Questa stima è viepiù conservativa in quanto non tiene conto né dello stoccaggio della CO<sub>2</sub> da parte delle enormi superfici pascolate dai ruminanti, né del fatto che le emissioni per produrre carne sintetica sono esclusivamente costituite da CO<sub>2</sub>, un gas che permane in atmosfera oltre un millennio, mentre oltre i 2/3 delle emissioni degli allevamenti derivano dal metano che resta in atmosfera meno di 10 anni (e che se le emissioni si riducono concorre a raffreddare l'atmosfera). In definitiva, queste stime portano a valutare in 2,5 volte il contributo al riscaldamento globale della carne artificiale rispetto a quella naturale (costituita da tutte le carni provenienti dalle diverse specie allevate) nel caso in cui tutta la domanda fino al 2030 fosse coperta dal prodotto industriale (lasciando immutato il quadro produttivo contemporaneo).

Recentemente è stato reso pubblico sulla piattaforma BioRxiv<sup>®</sup> un lavoro *pre-review* di un gruppo di ricerca dell'Università della California di Davis (Risner et al., 2023) che utilizza metodi di stima molto più accurati di quelli impiegati nelle precedenti pubblicazioni e arriva a una valutazione decisamente maggiore degli impatti della carne artificiale sull'ambiente. Gli autori partono da due modelli econometrici (TEA, *Tecno-Economic Assessment*), i cui schemi sono stati pubblicati ultimamente su riviste *peer-reviewed*, per derivare il processo di produzione della carne artificiale il più dettagliato possibile. Rispetto alle precedenti analisi di impatto riportate da Gursel et al. (2022), gli autori di questo studio rilevano che il processo di rimozione delle endotossine dal *medium* di crescita cellulare è uno dei fattori chiave. In particolare, i firmatari del lavoro ricordano che *“Le endotossine, note anche come lipopolisaccaridi (LPS), sono una componente critica della membrana esterna dei batteri Gram-negativi (ad es. Escherichia coli). Le endotossine contengono una frazione polisaccaridica idrofila, che è covalentemente legata a un lipide idrofobico noto come lipide A. I batteri Gram negativi sono ubiquitari nell'ambiente e si trovano comunemente nell'acqua di rubinetto. Nelle colture cellulari la presenza di endotossine può avere un'ampia varietà di effetti. Per esempio, a una concentrazione di endotossina di appena 1 ng/ml, i tassi di successo della gravidanza si riducono di 3-4 volte durante la fecondazione in vitro di embrioni umani. I batteri Gram negativi rilasciano piccole quantità di endotossina nell'ambiente quando proliferano e ne rilasciano grandi quantità quando sono inattivati.”* I processi di purificazione da queste endotossine ubiquitarie sono molto dispendiosi in termini di consumo di risorse e di impatti ambientali e sono necessari soprattutto quando si passa da colture cellulari di piccola entità, quali quelle attualmente in essere, a reattori di grandi dimensioni previsti per la produzione in scala industriale della carne artificiale. Gli autori hanno costruito 3 scenari base e altrettanti con fattori di purificazione dalle endotossine dei processi produttivi (figura 6): l'inclusione della purificazione, ritenuta dagli scienziati un processo indispensabile, porta a emissioni da un minimo di 246 a un massimo di 1.508 di CO<sub>2</sub>e per kg di prodotto, da 4 a 22 volte maggiori della mediana dei dati ottenibili in letteratura, riferita a emissioni per kg di carne bovina disossata, libera da grasso, con aggiunta di frattaglie. Se comparati al kg del mix di carni naturali attualmente disponibili sul mercato mondiale, questi impatti risultano da 10 a 50 volte maggiori. Alla luce di questi risultati, la conclusione degli autori è lapidaria: *“Il nostro modello contraddice in generale gli studi precedenti, suggerendo che l'impatto ambientale della carne coltivata è superiore a quello dei sistemi di carne bovina convenzionali, invece di essere più rispettoso dell'ambiente. Si tratta di una conclusione importante, dato che gli investimenti sono stati specificamente*

allocati a questo settore con la tesi che questo prodotto sarà più rispettoso dell'ambiente rispetto alla carne bovina.”.

Figura 6 – Comparazione fra impatto climalterante della carne bovina disossata (con frattaglie edibili) e la carne artificiale nei tre scenari esplorati da Risnet et al. (2023).

Figure 3. Comparison of GWP of the ACBM production scenarios and reported retail beef values (fat and bone free meat and edible offal).



Note: Book in graph 500 to 1400  
 \*FBM: Fat and bone free meat and edible offal  
 Dst= Dairy beef  
 Bst= Beef beef  
 Reported retail beef from Reducing food's environmental impacts through producers and consumers (Poore & Nemecek, 2018)

### 5. Cosa non conosciamo del processo di produzione della carne artificiale: dai pericoli potenziali al rischio effettivo.

Il recente report FAO-WHO (2023) prende in esame i pericoli potenzialmente connessi con la produzione di carne artificiale e li individua lungo tutta la filiera come riportato in figura 7.

Figura 7 – Pericoli riscontrabili durante la produzione di carne sintetica (FAO- WHO, 2023).

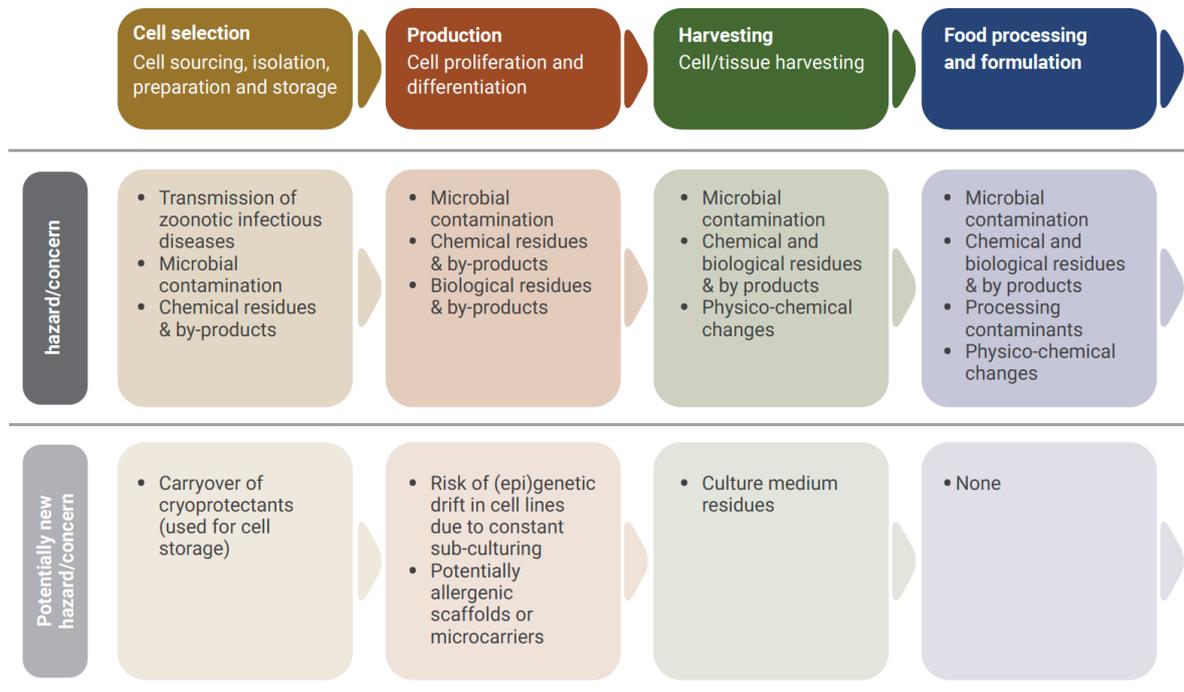
	Transmission of zoonotic infectious diseases	Residues and by-products	Novel inputs	Biological contamination
1. Cell selection	X	X		X
2. Production	X	X	X	X
3. Harvesting		X	X	X
4. Food processing		X	X	X

Source: FAO. 2022. Thinking about the future of food safety - A foresight report. Rome. <https://www.fao.org/3/cb8667en/cb8667en.pdf>

Alcuni di questi sono comuni ai processi di produzione di carne naturale, di medicinali o di alimenti fermentati o ultraprocesati, mentre altri sono specifici dell'ottenimento della biomassa industriale e della sua post-lavorazione, come illustrato nella tabella 8.

Nello specifico, il report (tabelle 5-8) individua 53 pericoli complessivamente nelle quattro fasi del processo di produzione, dei quali viene specificata la comunanza con altri processi conosciuti, in gran parte legati alla fase di trasformazione dei prodotti alimentari o farmaceutici.

Figura 8 – Pericoli specifici (sotto) della produzione di carne artificiale e pericoli comuni (sopra) con la produzione di carni naturali (FAO-WHO, 2023)



Source: Authors' own elaboration.

Gli autori del report, tuttavia, mettono in guardia che quanto riportato riguarda soltanto la primissima fase del processo di analisi e gestione del rischio, quella dell'individuazione dei potenziali pericoli, come illustrato nella figura 9.

Figura 9 – Livello di informazione del report FAO-WHO (2023) circa i pericoli potenziali della produzione di carne artificiale rispetto alla procedura standard di analisi e gestione del rischio.

Figure 11. Generic components of food safety risk analysis paradigm



Per le fasi di produzione e raccolta delle biomasse si riportano le osservazioni in originale dal report nel BOX 1.

Box 1 – Elenco originale di potenziali pericoli nella produzione di carne artificiale per la fase proliferativa e ipertrofica delle cellule (FAO-WHO, 2023)

### Potential hazards/concerns during cell selection

The cell sourcing, isolation and storage steps in cell-based food production may introduce microbial contaminations that could be propagated during subsequent production phases. A potential hazard is the transmission of zoonotic infectious diseases and foodborne pathogens from the source animal that is used to obtain biopsies, although the chances are considerably lower compared with conventional livestock breeding (Treich, 2021). Commonly encountered pathogenic bacteria that reside on or in animals and their faeces include *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* and *Listeria*, and also of specific importance is the transmission of pathogenic *Mycoplasma* species (spp.). Along with these bacteria other pathogens that might contaminate cell lines are animal-derived viruses and parasites (FAO/WHO, 2014; Ong *et al.*, 2021).

To prevent contamination by microorganisms during cell sourcing, isolation and storage, it is common practice to use antibiotics and some of these antibiotics might be used further in the initial cell proliferation phase (seed stage). Cryoprotectants are used for cell storage of production cell lines in cell banks. Common cryoprotectants used for the cryopreservation of cell lines include dimethyl sulfoxide, (poly)ethylene glycol, trehalose and sucrose (Choi *et al.*, 2021), where DMSO has been shown to exert negative toxicological effects (Awan *et al.*, 2020). Antibiotics and cryoprotectants are diluted to very low concentrations or washed-out during production scale-up and their levels in the final products will be safe for consumption.

### Potential hazards/concerns during production

Cell cultivation is sensitive to microbial contamination and is therefore performed under sterile cultivation conditions.

Among the bacteria that commonly infect eukaryotic cell lines, *Mycoplasma* spp. are of chief concern, as several *Mycoplasma* spp. are known human pathogens and they are known to cause crashing of cell culture growth and are difficult to eradicate during biomanufacturing (Nikfarjam and Farzaneh, 2012). During manufacturing, contamination by other bacteria, yeast and fungi from the production environment can also occur, in particular spore-forming bacteria and fungi that are difficult to kill off and can spread easily by air are of concern (Møretro and Langsrud, 2017; Snyder *et al.*, 2019). The risk of contamination by viruses and infectious prions may also exist when animal-derived serum or animal-derived medium components are used for cell cultivation (Hadi and Brightwell, 2021, Ong *et al.*, 2021). While testing or controlling such viruses and infectious prions is a significant challenge, sufficient heat processing may provide a solution. To limit the occurrence of contaminations, early detection of infections in cell cultures via regular monitoring is critical, as well as following good hygiene practices (GHPs) throughout the whole production process, such as common cleaning and sterilization practices for equipment. Replacing animal-derived components with non-animal derived components from plants or recombinant sources can also reduce the chance of contaminations. As cell cultivation is performed in strictly controlled sterile culture conditions the use of antibiotics is drastically reduced or can be eliminated. It will thereby reduce the risk of human exposure to antibiotics as well as the development of antimicrobial resistance. Alternatives to antibiotics to prevent microbial contamination could be the use of approved chemical preservatives such as sodium benzoate or other antimicrobial compounds (Zidaric *et al.*, 2020).

At the level of the cell lines used, there is a risk of (epi)genetic drift in cell lines due to constant sub-culturing, where mutations build up over time that may eventually cause changes in phenotypes (Soice and Johnston, 2021).

The use of quality-controlled cell banks of cryopreserved cell lines is a way to mitigate the risk of losing cell-line fidelity to genetic drift, as well as protecting against the presence of viruses, bacteria, yeast and *Mycoplasma* spp.

### **Potential hazards/concerns during harvesting**

Common media used for cell cultivation are complex mixtures of salts, sugars (glucose), vitamins, amino acids, organic acids, growth factors and hormones (O'Neill *et al.*, 2021). A substantial part of these chemical and biological components and their residues are removed during cell harvesting or destroyed in subsequent processing steps (e.g. due to heating). However, harvesting may also introduce enzymes or chemicals, e.g. those that are required for the dissociation of microcarriers, including enzymes such as proteases, non-enzymatic dissociation agents such as dextran sulphate, N-acetyl-L-cysteine and dithiothreitol, or chelating agents like EDTA (Bodiou *et al.*, 2020 Ong *et al.*, 2021). Of special attention is the use of biological components such as growth factors and hormones from animal (serum) or non-animal origin, as these biologically active molecules might interfere with the metabolism or have been associated with the development of certain cancers (Ong *et al.*, 2021). Harvesting is also a step that can introduce microbial contamination and harvesting methods should be designed in a way that minimizes the chance of microbial contamination.

Questi argomenti sono stati analizzati indipendentemente da un altro lavoro (Broucke et al., 2023) e il risultato, riportato nella tabella della figura 10 ripresa integralmente dal paper, mostra che i pericoli potenziali individuati sono della stessa natura di quelli indicati dal report FAO-WHO (2023).

Figura 10 – Pericoli potenziali legati alla produzione di carne artificiale (Broucke et al., 2023)

Table 2

Overview of potential food-safety hazards/risks related to in vitro meat production system (IMPS) and possible interventions/measure/solutions based on information and references retrieved from literature reviews (Langdon, 2004; Bhat, Kumar and Fayaz, 2015; Post et al., 2020; Hadi & Brightwell, 2021; Ong et al., 2021).

IMPS step	Phase	Material	Potential hazard/risk	Possible interventions/measures/solutions	Remarks	References
Cell culturing	Source selection		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Microbial contamination (bacteria, viruses, yeast, fungi, parasites), prions</li> <li>• Antibiotics<sup>a</sup></li> <li>• Cell types used, including genetically engineered cells (iPSC)</li> <li>• Production of secretion products (e.g. signaling molecules with possible interaction with human receptors (e.g. hormonal effect)), novel products (allergens, unknown safety-effect), bulk cell material as end product, etc.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Isolating animal-derived cells from low-risk animals;</li> <li>• certified BSE-free source animals, targeted tissue selection (e.g. higher chance for presence of prions in tissues like brain, blood, etc. of afflicted animals); thorough inspection of source animals and biopsied tissues and cells</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No slaughtering</li> <li>• Antibiotics needed at earlier stages compared to conventional meat production and washed off by rinsing the cells</li> <li>• Genetic engineering could help to reduce the meat allergy alpha-gal syndrome by removal of the causing sugars on the cell surface</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Jayme &amp; Smith, 2000;</li> <li>• Gough &amp; Maddison, 2010;</li> <li>• U.S. Food and Drug Administration, 2020</li> </ul>
		Storage	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Microbial contamination (bacteria, viruses, yeast, fungi, parasites), prions</li> <li>• Residues of (novel) cryoprotectants</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Evaluation of safety of genetic engineered cells (see 6 Legislation/regulatory aspects)</li> <li>• Agent/residue testing</li> <li>• Safety assessment</li> <li>• Storage of cell banks in vapour phase (instead of liquid nitrogen)</li> <li>• Evaluating possible alternative cryoprotectants already used as food processing aids</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• U.S. Food and Drug Administration, 2010; Erol et al., 2021</li> </ul>
	Cell (sub) culturing/handling	Cells	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Microbial contamination (bacteria, viruses, yeast, fungi, parasites)</li> <li>• Antibiotics<sup>a</sup></li> <li>• Genetic drift and unintentional changes compared to the original cell type, tendency of adult stem cells to transform malignant in long-term culture) of particular and major concern</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sterile and controlled conditions, fresh vials of banked cells for each new batch</li> <li>• Evaluation of possible changes</li> <li>• Agent/residue testing</li> <li>• Safety assessment</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lower concentrations of antibiotics needed and at earlier stages compared to conventional meat production</li> <li>• Reduced chances of residues by cell rinsing steps during culturing</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hughes et al., 2007;</li> <li>• Lazennec &amp; Jorgensen, 2008; Jayme &amp; Smith, 2000</li> </ul>
		Medium	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Microbial contamination (bacteria, viruses, yeast, fungi, parasites), prions, impurities of remaining proteins or pyrogens (e.g. endotoxins)</li> <li>• Antibiotics<sup>a</sup></li> <li>• Residues of added of exogenous compounds (e.g. growth factors)</li> <li>• Allergens</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Isolating animal-derived cell-media compounds (e.g. FBS) from low-risk animals or non-animal origin</li> <li>• Serum substitutes/alternatives or serum-free media</li> <li>• Flushing/washing steps</li> <li>• Caution with recycling/reuse of cell-culture media (risk of bio-accumulation of unwanted agents or compounds)</li> <li>• Sensors</li> <li>• Agent/residue testing</li> <li>• Safety assessment</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Jayme &amp; Smith, 2000</li> </ul>
	Scaffolds, microcarriers and (chemical or enzymatic) dissociation	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Scaffolds and chemical cell-separation techniques used</li> <li>• Chemically synthesized materials themselves, chemical and enzymatic cross-linking agents (e.g. photo-initiators, aldehydes), residues or degradation (by)products thereof</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Food-grade scaffolds and reagents</li> <li>• Flushing/washing steps</li> <li>• Agent/residue testing</li> <li>• Safety testing</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• GAO report, 2020; Oryan et al., 2018; Stephens et al., 2018</li> </ul>	
	Other	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Migration or residues of organic and inorganic substances from disposable products (e.g. plastics, filters), coatings (e.g. equipment), packaging and cleaning products</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Food-grade materials/solutions/etc.</li> <li>• Agent/residue testing</li> </ul>			
Food processing			<ul style="list-style-type: none"> <li>• Novel ingredients or existing compounds in higher concentrations than in conventional meat production (e.g. protein hydrolysates as potential allergenic compounds)</li> <li>• Similar to those of conventional meat production</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Treatments (heat, high-pressure, irradiation, etc.)</li> <li>• Monitoring/testing</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Some compounds may be resistant to treatment</li> </ul>	

<sup>a</sup> effects on cell themselves, as well as residue issues due to risk for resistance and other unwanted effects (e.g. disturbance of the gastrointestinal flora).

A questo punto, risulta chiaro che a fronte di pericoli potenziali individuati dagli esperti e riportati nella letteratura, mancano le prove della loro rilevanza sulla popolazione esposta: **ciò che non conosciamo** è pertanto il rischio associato alla produzione di carne artificiale. Questo *gap* conoscitivo è stato evidenziato da un lavoro scientifico (Ong et al., 2021) che ha esplorato la percezione del rischio presso i produttori di questo tipo di biomasse e le necessità di approfondimento scientifico e tecnologico per garantire la sicurezza alimentare delle carni artificiali. Si riportano di seguito le priorità di ricerca individuate dai produttori di carni artificiali (Ong et al., 2021):

1. *Evaluation of the inputs (e.g., growth factors, antibiotics, scaffold, novel inputs), as compared to conventional foods;*
2. *Identification of the types of inputs and concentrations used in the product;*
3. *Determination of where in the process the inputs are used;*
4. *Assessment of the efficacy of the removal steps;*
5. *Evaluation of the safety of the residues for use in food.*
6. *Determination of the significance of health status of the source animal in relation to potential for disease propagation in vitro.*

7. *Confirmation that cell-cultured products are less susceptible to contamination than conventional foods.*
8. *Assessment of the range of genetic modification approaches and outcomes that affect safety:*
9. *Identification of novel metabolites or expression products;*
10. *Evaluation of the potential for DNA to be transferred to gut or environmental microbes;*
11. *Development of industry-wide standards for safe residue levels of common inputs.*
12. *Evaluation of the comparative approach for the safety assessment of the final product:*
13. *Development of methods for comparative nutritional analysis.*
14. *Development and validation of animal-free safety testing methods;*
15. *Development of digestion and microbiome safety assessments with regard to inputs of concern such as growth factors.*
16. *Assessment of whether there are any novel allergens in the final product.*
17. *Assessment of whether media recycling concentrates hazardous inputs/residues.*
18. *Evaluation of environmental effects of waste products and determine appropriate disposal.*
19. *Evaluation of whether any novel food processing techniques affect safety of the final product.*

## **6. Conclusioni**

Da quanto qui sommariamente esposto, si possono trarre alcune brevi osservazioni.

1. Il processo di produzione della carne artificiale è *l'up-grade* di analoghe procedure impiegate da decenni nell'industria farmaceutica per la produzione di biotessuti e biofarmaci. La differenza risiede nello scopo della proliferazione cellulare orientata in questo caso alla produzione di cibo e non di presidi sanitari.
2. La complessità di ottenere enormi biomasse (migliaia di tonnellate) in modalità extracorporea, impone lo sviluppo di tecnologie molto complesse e, in quanto tali, fragili e soggette a errori in grado di compromettere non solo il prodotto, ma anche la salute dei cittadini consumatori e dell'ambiente.
3. Seppure i potenziali pericoli siano stati individuati, manca totalmente la valutazione dei connessi rischi per poter procedere in modo corretto all'applicazione dei protocolli standard di analisi-gestione-comunicazione degli stessi.
4. I rischi di natura ambientale derivanti dalla produzione di carni artificiali sono meglio conosciuti di quelli legati alla sicurezza alimentare di questi prodotti. Per quanto finora noto, le stime più benevole basate sulla LCA, riportano un impatto climalterante medio di 2,5 volte superiore per le carni artificiali rispetto a quello del mix di carni oggi prodotte dagli allevamenti zootecnici; stime più precise, tuttavia, suggeriscono impatti decisamente maggiori, da 10 a 50 volte per la carne artificiale rispetto al mix prodotto naturalmente oggi.

### ***Bibliografia e sitografia citata***

Bernardi E., Capri E., Pulina G., 2023. Carni e salumi, le nuove frontiere della sostenibilità. Franco Angeli Editore, Roma. ISBN 978-88-351-4744-2

Broucke K., Pamel E.V., Coilie E.V., Herman L., Royen G.V., 2023. Cultured meat challenges ahead: a review on nutritional, technofunctional and sensorial properties, safety and legislation. *Meat Science*, 195, <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2022.109006>

Choi K-H., Yoon J., Kim M., Lee H.J., Jeong J., Ryu M., Jo C., Lee C-K., 2021. Muscle stem cell isolation and in vitro culture for meat production: a methodological review. *Compr. Rev. Food Sci. Food saf.*, 20: 429-457.

FAO -WHO. 2023. Food safety aspects of cell-based food. Rome. <https://doi.org/10.4060/cc4855en> .

Faostat, 2023. <https://www.fao.org/faostat/en/#compare>

Guam Y.H., Kemp R.B., 1999. Detection of the changing substrate requirements of cultured animal cells by stoichiometric growth equations validated by enthalpy balances. *Journal of Biotechnology*, 69: 95–114.

Gursel I.V., Sturme M., Hugenholtz G., Bruins M., 2022. Review and analysis of studies on sustainability of cultured meat. Wageningen Food & Biobased Research, Wageningen (NL). DOI 10.18174/563404.

Humbird D., 2021. Scale-up economics for cultured meat. *Biotechnol Bioeng.*, 118:3239–3250.

OECD/FAO, 2021. OECD-FAO Agricultural Outlook 2021-2030, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/19428846-en>.

Ong K.J., Johnston J., Datar I., Sewalt V., Holmes D., Shatkin J.A., 2021, Food safety consideration and research priorities for the cultured meat and seafood industry. *Comp. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 20: 5421-5448.

Pajcin I., Knežić T., Savic A., Zoulay I., Vlajkov V., Djisalov M., Janjušević L., Grahovac J., Gadjanski I., 2022. Bioengineering Outlook on Cultivated Meat Production. *Micromachines* 2022, 13, 402. <https://doi.org/10.3390/mi13030402>

Risner D., Negulescu P., Kim Y., Nguyen K., Siegel J.B., Spang E.S., 2023. Cradle to production gate life cycle assessment of cultured meat growth media: A comparison of Essential 8™ and Beefy-9. *BioRxiv*. doi: <https://doi.org/10.1101/2023.04.21.537772>

Stout, A. J., Mirliani A. B., White E. C., Yuen Jr J. S., Kaplan, D. L., 2022. Simple and effective serum-free medium for sustained expansion of bovine satellite cells for cell cultured meat. *Commun Biol.*, 2;5(1):466. doi: 10.1038/s42003-022-03423-8

## Allegato

Diagrammi riportanti il numero di pubblicazioni estratte da Scopus® con l'impiego delle parole chiave  
"cultivated or cellular or artificial and meat"

