

ARTICLE

한우 골격근 유래 고순도 근육 세포의 효율적 분리를 위한 최적화된 Pre-Plating 프로토콜

이슬희¹ · 박상훈² · 박규태² · 장소영² · 최정석^{2*}

¹농촌진흥청 국립축산과학원 축산푸드테크과, ²충북대학교 축산학과

Optimized Pre-Plating Protocol for Efficient Enrichment of High-Purity Muscle Cells from Hanwoo Skeletal Muscle

Sol-Hee Lee¹, Sanghun Park², Gyutae Park², Soyoung Jang², Jungseok Choi^{2*}

¹Animal Resources Food Tech Division, National Institute of Animal Science, RDA, Wanju 55365, Korea

²Department of Animal Science, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea

Received: January 21, 2026

Revised: February 13, 2026

Accepted: February 13, 2026

*Corresponding author :

Jungseok Choi
Department of Animal Science,
Chungbuk National University, Cheongju
28644, Korea
Tel : +82-43-261-2551
E-mail : jchoi@chungbuk.ac.kr

Copyright © 2026 Resources Science Research Institute, Kongju National University. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ORCID

Sol-Hee Lee
<https://orcid.org/0000-0003-1124-7095>
Sanghun Park
<https://orcid.org/0000-0003-4804-0848>
Gyutae Park
<https://orcid.org/0000-0003-1614-1097>
Soyoung Jang
<https://orcid.org/0009-0001-1146-2695>
Jungseok Choi
<https://orcid.org/0000-0001-8033-0410>

Abstract

Efficient purification of homogeneous muscle satellite cells is essential for enhancing the scalability of cultured meat production. However, existing purification techniques are often labor-intensive and costly, posing challenges for industrial application. In this study, we developed a simplified and cost-effective pre-plating method to separate muscle cells from fibroblasts. Initially, thawed cells were seeded onto collagen-coated flasks (CT) and incubated for 1 hour. The adherent cells were then transferred to Matrigel-coated flasks and cultured for 4 days. After proliferation, the cells were detached, re-seeded onto collagen-coated flasks, and incubated for 5 minutes. The supernatant containing non-adherent cells was subsequently transferred to Matrigel-coated flasks. This cycle was repeated five times to enrich for muscle satellite cells. Final cell populations from collagen-coated (CS) and Matrigel-coated (CF) flasks were cultured for 3 days and analyzed. RT-qPCR results showed the highest expression of PAX7 and MYOD1 in CS, indicating a predominance of myogenic cells. Conversely, VIM and PDGFA expression levels were elevated in CT and CF, suggesting higher fibroblast content. These findings were corroborated by immunofluorescence staining, which showed increased PAX7 positive nuclei in CS, and enhanced vimentin-positive nuclei in CF. Overall, this modified pre-plating approach provides an effective and scalable method for enriching muscle satellite cells, facilitating downstream applications in cultured meat production.

Keywords

Satellite cells, Pre-plating method, Cell purification, Bovine skeletal muscle, Cultured meat

1. 서론

최근 몇 년 동안 지속가능성, 환경적 부담, 그리고 동물 복지에 대한 우려에서 비롯되어, 기존 육류 생산 방식에 대한 대안이 필요하다는 인식이 확산되고 있다(Andreani *et al.*, 2023). 세계 인구 증가와 개발도상국의 육류 소비 확대에 따라 육류 수요는 앞으로 40년 내에 두 배로 증가할 것으로 예측된다(Kleyn and Ciacciariello, 2021). 따라서 기존 생산 방식은 경작지와 사료 자원의 한계로 인해 지속 가능하기 어려울 수 있다. 또한 가축 사육은 온실 가스 배출, 토지, 물, 에너지 소비 등 환경에 큰 부담을 주고 있으며, 생명공학적인 방법을 통해 이러한 영향을 줄일 수 있는 가능성이 제시되고 있다(Gill *et al.*, 2021). 동물 복지 문제 역시 소비자 인식에 영향을 미치며, 고기 섭취와 관련된 식품 매개 병원균에 의한 감염도 중요한 문제로 부각되고 있다(Warmate and Onarinde, 2023). 이와 같은 복합적

인 이유로 가축 고기를 대체할 수 있는 새로운 식품 생산 방식, 특히 배양육과 같은 조직 공학 기반 대안의 개발이 필요한 실정이다.

배양육 생산의 초기 단계에서 주로 사용되는 세포는 위성세포 또는 근육 전구세포이며, 이들은 일반적으로 조직에서 분리된 후 체외배양을 통해 증식된다(Choi et al., 2021). 일반적으로 조직 유래 세포는 섬유아세포나 지방세포 등 비 근육계 세포와 혼합되어 분리되며, 이러한 불순 세포의 존재는 근육 조직의 구조 형성을 저해하고, 영양학적 균질성과 관능적 특성에 부정적인 영향을 미친다(Guan et al., 2022). 또한, 비근육계 세포군은 제품 간 일관성과 재현성을 확보하는데 문제를 일으킨다(Melzener et al., 2024). 이에 따라 배양육 생산에서는 타겟 세포의 순도를 높이기 위한 정제 기술이 필수적이며, 대표적으로 유세포 분석, 면역자기분리, pre-plating 등이 활용된다(Lee et al., 2024). 이러한 기술을 통해 세포군을 확보하면 근육세포의 증식과 분화 효율이 향상되고, 최종 제품의 품질 및 안전성 확보는 물론 산업화 가능성 또한 높아질 수 있다.

이 중 pre-plating은 근육 전구세포의 순도를 높이기 위해 널리 사용되는 간단하고 비용 효율적인 세포 정제 기법이다(Li et al., 2022). 이 방법은 서로 다른 세포 유형 간의 부착 속도 차이를 이용하여 목적 세포를 선별하는 방식이다. 이러한 부착 속도 차이는 세포 유형별 integrin 발현 양상과 세포외기질과의 상호작용 특성에 기인한다. 섬유아세포는 콜라겐과 강하게 결합하는 반면, 근육 위성세포는 $\alpha 7\beta 1$ integrin을 통해 laminin과 선택적으로 결합하며, 특히 quiescent 상태의 위성세포는 integrin 및 focal adhesion 활성이 낮아 상대적으로 느린 부착 특성을 나타낸다. 이러한 생물학적 특성 차이가 pre-plating 과정에서 근육 위성세포의 선택적 분리를 가능하게 한다. 일반적으로 조직에서 분리한 혼합 세포를 먼저 콜라겐 또는 Matrigel이 코팅된 플라스크에 단시간 부착한 후, 부착된 비근육계 세포를 제거하고, 부착되지 않은 근육 위성세포를 분리하는 과정을 반복한다. 이러한 단계적 분리 과정을 통해 점차적으로 근육 세포의 순도가 향상되며, 이후 배양 과정에서는 동질성이 높은 세포군을 확보할 수 있다(Lavasani et al., 2013). 이 방법은 별도의 특수 장비 없이 수행할 수 있어 기술적 접근성이 높고, 실용성이 높다고 알려져 있다.

따라서 본 논문은 배양육 생산에서 pre-plating 방법을 활용하여 근육 전구 세포의 순도를 향상시키는 방안을 고찰하는데 있다. 이를 통해 고품질 배양육 생산과 산업화 가능성 제고에 기여하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 근육 조직 채취

충청북도 청주시 청원구에 위치한 팜스토리한냉 중앙공장에서, 각각 33, 34개월령의 한우 거세우에서 우둔살을 채취하였다. 동물의 사육 및 처리 과정은 충북대학교 동물실험윤리위원회 (IACUC)의 심의를 거쳐 승인된 절차에 따라 이루어졌다(승인번호: CBNUA-2107-23-01).

2. 세포 추출

근육조직은 한우로부터 채취하였으며, 채취한 조직은 냉장 상태로 실험실로 옮겨 실험에 이용되었다. 과도한 지방과 결합조직을 제거한 뒤 조직을 미세하게 절단하고, collagenase type II(600 units/mL) Worthington, Lakewood, NJ, USA, Cat # LS004176)와 3% penicillin-streptomycin-amphotericin B(PSA)가 함유된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco, Cat # 11995065) 배지에 35 mL당 10 g의 조직을 첨가하여 37°C water bath에서 30분간 효소처리하였다. 이후 피펫으로 여러 차례 조직을 혼합하며 해리 유도한 후 40 μ m 나일론 메시 필터를 이용하여 여과하였다. 두차례 원리분리(70 \times g, 5 min; 펠릿, 800 \times g, 5 min; 상층액) 후 ACK(Ammonium-Chloride-Potassium) lysis buffer를 이용하여 적혈구를 제거하였다. 수집된 세포는 세포 수의 확보와 불순물 제거를 위해 2회 계대배양하

였으며, F10(Ham's F10 nutrient mix, Gibco, Cat # 11550043) 배지에 20% FBS, 1% PSA를 첨가한 조건에서, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하여 이후 실험에 사용하였다.

3. Pre-Plating 방법

섬유아세포와 근육 위성세포의 부착 속도 차이를 이용한 pre-plating 방법을 통해 근육 위성세포를 분리하였다. Passage 2 cell을 콜라겐 코팅 플라스크에 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 1시간 동안 배양하였으며, 이때 부착된 세포들을 CT(control treatment)라고 명명하였다. 이후 부착된 세포를 Matrigel 코팅 플라스크로 옮겨 4일 동안 배양하였다. 70~80% confluent 후, Trypsin-EDTA로 세포를 분리하여 콜라겐 코팅 플라스크에 다시 분주하고 5분간 배양하였다. 웨이킹한 후 상층액을 회수하여 콜라겐 코팅 플라스크(CS)에 접종하였고, 부착세포를 Trypsin-EDTA로 회수한 후 상온에서 5분간 가온하고 부드럽게 웨이킹하는 과정을 5회 반복하였다. 남아 있던 세포는 그대로 매트리지젤 코팅 플라스크(CF)에 부착하여 최종 세포 집단을 3일 동안 배양하여 분석하였다(Fig. 1)(Yoshioka *et al.*, 2020).

4. 면역형광염색

증식이 완료된 세포는 4% paraformaldehyde 용액에서 37°C로 45분간 고정한 후, 잔여 고정제를 제거하기 위해 PBS(Phosphate-buffered saline)로 10분씩 두 차례 세척하였다. 이후 세포막 투과를 위해 0.1% Triton X-100(PBS 기반)을 상온에서 20분간 처리하였다. 투과 처리 후 2% bovine serum albumin(BSA) 용액을 이용하여 비특이적 항체 결합을 차단하기 위해 30분간 blocking을 실시한 뒤 PBS로 세척하였다. 이후 증식된 세포를 각각 2% BSA에 1:100으로 희석한 일차 항체 Pax7(PA5-68506, Invitrogen, USA), MYOD1, Vimentin, 및 PDGFa와 반응시키기 위해 각 well에 분주하고, 4°C에서 overnight incubation을 수행하였다. 항체 결합 후 잔여 항체 제거를 위해 0.05% Tween-20(PBS 기반)으로 10분간 세척하였다. 이후 1:100으로 희석한 cross-adsorbed anti-rabbit IgG(A21121, Invitrogen)를 사용하여 상온에서 30분간 2차 항체 반응을 진행하였다. 핵 염색은 Hoechst 33342(1:2000; H3570, Invitrogen)를 처리하여 실시하였고, 이후 PBS로 세척하여 잔여 염색 물질을 제거하였다. 모든 처리 과정이 완료된 세포는 형광현미경을 이용하여 이미지를 획득하였다. 이미지 분석은 ImageJ 소프트웨어를 통해 진행하였으며, 이미지 분석 및 핵 수를 계수하였다.

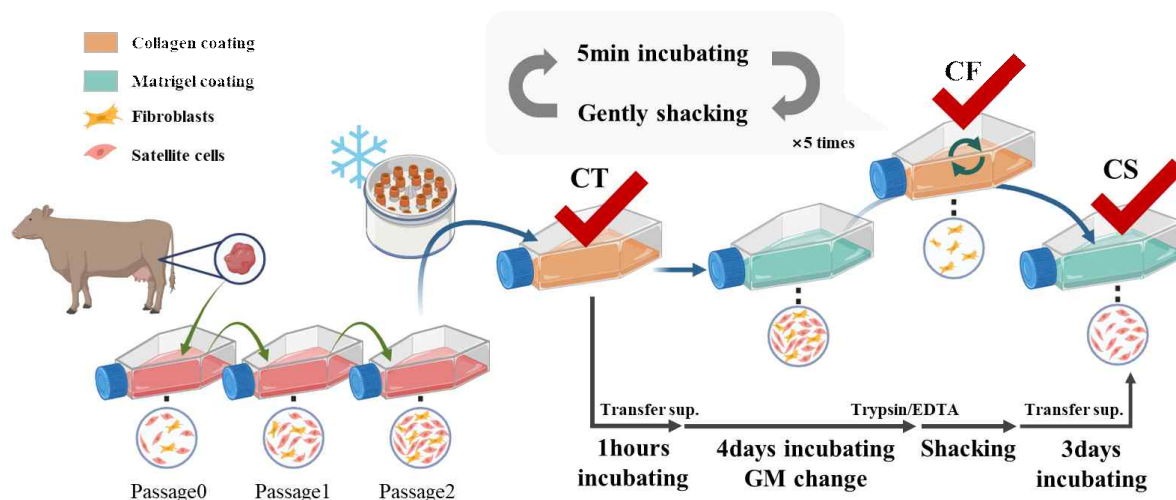


Fig. 1. Schematic illustration of the pre-plating method for selective enrichment of bovine satellite cells through differential adhesion and gentle shaking. CT: control treatment; CS: satellite cells; CF: fibroblast cells.

5. 정량적 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응(Reverse Transcription-Quantitative Polymerase Chain Reaction(RT-qPCR))

부착 속도에 맞춰 배양된 세포는 TRIzol 시약을 이용하여 플라스크에서 회수하였고, 이를 정량적 유전자 발현 분석을 위한 샘플로 이용하였다. 총 RNA는 iNtRON Biotechnology(Seongnam, Korea)에서 제공하는 Total RNA Extraction Kit를 이용하여 분리하였으며, 추출된 RNA는 Thermo Fisher Scientific의 역전사 키트를 제조사의 프로토콜에 따라 처리하여 cDNA로 합성하였다. 유전자 발현 정량 분석은 RT-qPCR 방법을 이용하여 SYBR Green 시약(ELPIS-BIOTECH, Daejeon, Korea)과 Table 1에 제시된 primer를 사용하여 수행하였다. PCR 반응 조건은 50°C에서 2분간 초기 반응 후, 95°C에서 10분간 초기 변성 과정을 거쳤으며, 이후 95°C에서 15초, 52~55°C에서 1분간의 반응을 40회 반복하여 증폭하였다. 유전자 발현 정량은 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방식으로 계산하였다(Livak and Schmittgen, 2001).

6. 통계분석

모든 데이터는 평균과 표준편차로 표기하였으며, 실험은 총 3회 이상 반복하여 실험을 진행하였다. 통계 분석은 SAS program(version 9.4; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)의 General Linear Model (GLM) procedure를 이용하여 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 실시한 후 Duncan's multiple range test로 사후검정을 수행하였다. GLM 분석은 control treatment(CT) 그룹에서의 PAX7 양성 핵수와 Vimentin(VIM) 양성 핵수 비교(Fig. 3), CS 및 CF 처리구 간 PAX7 양성 핵수 비교(Fig. 4), CS 및 CF 처리구 간 VIM 양성 핵수 비교(Fig. 5), 그리고 CS 및 CF 그룹에서 RT-qPCR로 측정된 PAX7, MYOD1, VIM 및 PDGFA 유전자의 상대적 발현량 비교(Fig. 6)에 적용하였다. 모든 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 수준에서 판단하였다.

III. 결과 및 고찰

1. CT, CS 및 CF 세포의 형태학적 특성 분석과 PAX7 및 Vimentin의 면역형광 염색 및 핵 정량 분석

CT 그룹에서는 근육세포와 섬유아세포가 혼재된 형태로 관찰되었으며, 배양 기간 동안 다양한 형태의 세포들이 불균일한 집락을 형성하였다. CS 및 CF 그룹 역시 세포 형태에서 일부 차이가 관찰되

Table 1. Sequences of primers used in the RT-qPCR

Primer	Description	Accession	Sequence (5'→3')	Product size
PAX7	Paired box 7	XM_027522153	F: AGCCGGGTTAGCAAGATACT R: GAAACTCTGGCTGACCTTGA	234
MYOD1	Myogenic differentiation 1	AB110599	F: AACAGCGGACGACTTCTATG R: GTTAGTCGTCTTGCGTTTGC	185
VIM	Vimentin	NM_173969	F: TCGCCAACATACATCGACAAG R: GAGCCTCATGATGTCTTCGG	215
PDGFA	Platelet-derived growth factor subunit A	NM_001192345	F: AGACAGGAGCACAGTGGAAAG R: CAACGGATTTACATACCTTGG	240
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	NM_001034034	F: ACTCCCAACGTGTCTGTTGT R: CCAGCATCGAAGGTAGAAGA	185

었으나, 형태학적 관찰만으로는 위성세포와 섬유아세포를 명확히 구분하기는 어려웠다(Fig. 2). 이러한 결과는 pre-plating 과정에 따른 세포 부착 특성의 차이가 형태학적 특성보다는 분자적 표지자의 분석을 통해 보다 명확히 확인될 필요가 있음을 시사한다.

Fig. 3은 CT 그룹에서 PAX7 및 Vimentin(VIM)에 대한 면역형광 염색을 각각 수행한 결과를 나타낸 것이다. PAX7 면역형광 염색에서는 PAX7 양성 핵이 관찰되었으며, VIM 염색에서도 VIM 양성 핵이 확인되었다. 각 마커에 대해 독립적으로 핵 수를 계수한 결과, CT 그룹 내에서 PAX7⁺ 핵과 VIM⁺ 핵이 모두 존재하는 것으로 나타났으며, 이는 콜라게나아제 처리 후 획득된 초기 세포 집단이 근육위성세포와 섬유아세포가 혼재된 이질적인 세포 집단임을 시사한다. 이러한 결과는 초기 세포 집단으로부터 특정 세포군을 정제하기 위해 pre-plating 과정이 필요함을 뒷받침한다. CS와 CF 그룹의 PAX7과 VIM 발현 비교는 각각 Fig. 4 및 Fig. 5에 나타내었다. CS 그룹 내에서 PAX7⁺ 핵이 CF 그룹에 비해서 현저하게 많은 것을 확인하였다($p < 0.05$, Fig. 4). 이는 pre-plating 과정을 통해 근육위성 세포가 효과적으로 분리되었음을 보여준다. 반면에 CF 그룹은 VIM 양성 세포가 다수를 차지하였으며, CS 그룹은 VIM⁺ 핵이 현저히 적은 것을 확인할 수 있었다($p < 0.05$, Fig. 5). 이는 섬유아세포가 CF 그룹으로 분리되었음을 의미하며, 동시에 CS 집단의 위성 세포 순도가 높음을 뒷받침하는

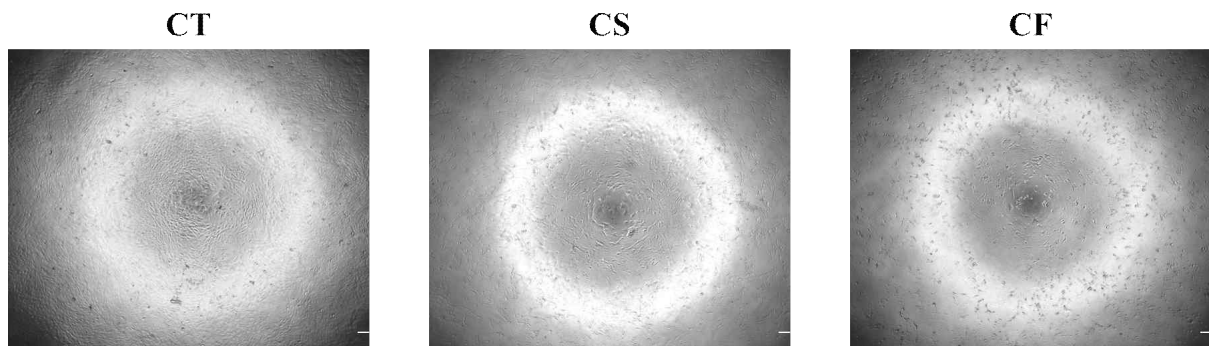


Fig. 2. Morphological comparison of cell populations according to preplating duration (Day 3 of culture). The images were taken at 40× magnification. Scale bar is 100 μm. CT: collagenase total cells, CS: collagenase satellite cells, CF: collagenase fibroblasts.

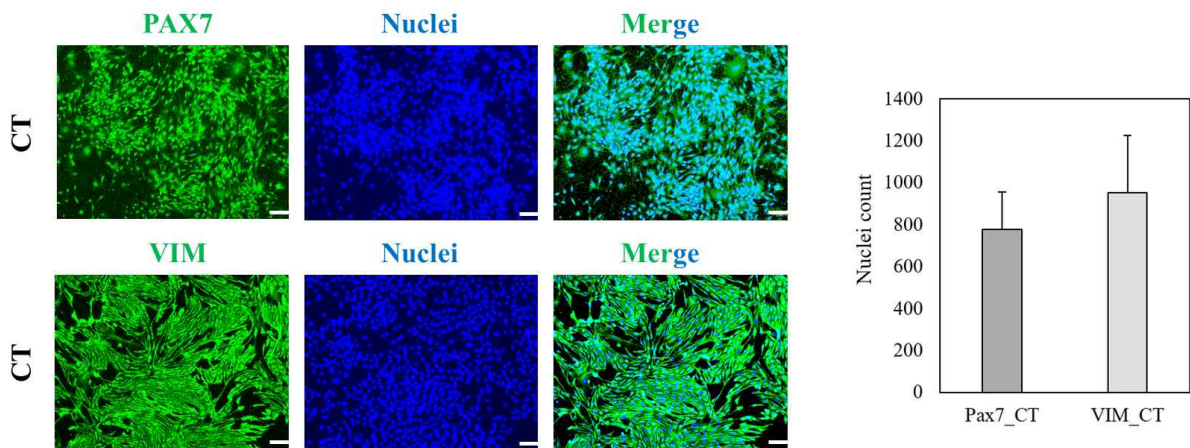


Fig. 3. Immunofluorescence staining of satellite cell markers in cultured cells under different preplating conditions. The images were taken at 100× magnification. Scale bar is 100 μm. Cells were stained with antibodies against PAX7, VIM (green) and nuclei were counterstained with DAPI (blue). Representative images show the distribution and abundance of PAX7- and VIM- positive cells. CT: collagenase total cells.

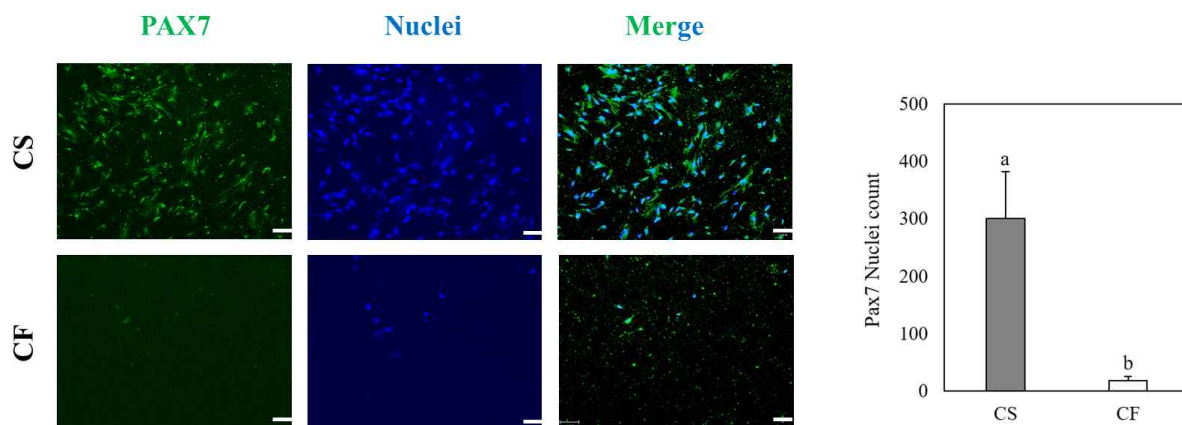


Fig. 4. Immunofluorescence staining of satellite cell markers in cultured cells under different preplating conditions. The images were taken at 100× magnification. Scale bar is 100 μm. Cells were stained with antibodies against PAX7 (green), and nuclei were counterstained with DAPI (blue). Representative images show the distribution and abundance of PAX7- positive cells. CS: collagenase satellite cells, CF: collagenase fibroblasts. ^{a~b} Values are presented as mean±standard deviation. Different letters indicate significant differences ($p<0.05$).

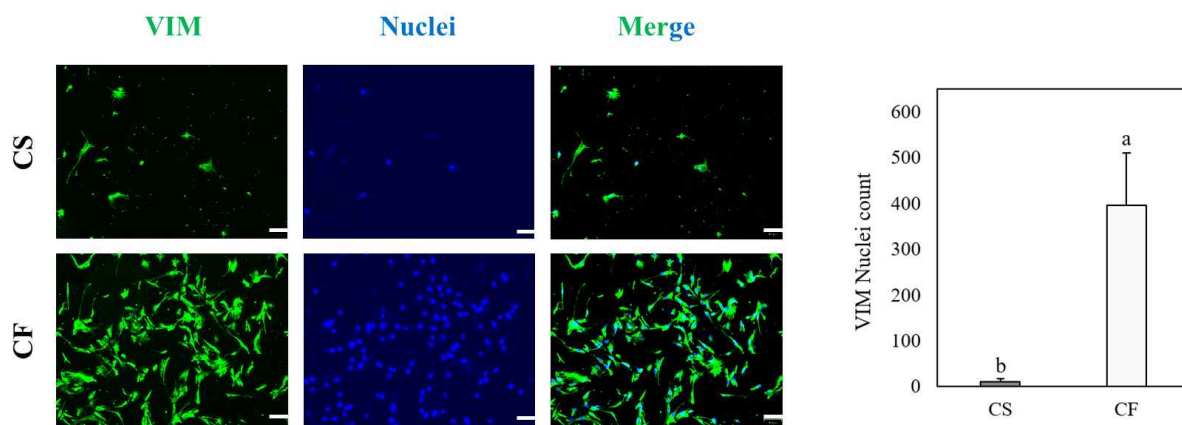


Fig. 5. Immunofluorescence staining of satellite cell markers in cultured cells under different preplating conditions. The images were taken at 100× magnification. Scale bar is 100 μm. Cells were stained with antibodies against VIM (green) and nuclei were counterstained with DAPI (blue). Representative images show the distribution and abundance of VIM- positive cells. CS: collagenase-isolated satellite cells, CF: collagenase-isolated fibroblasts. ^{a~b} Values are presented as mean±standard deviation. Different letters indicate significant differences ($p<0.05$).

결과로 사료된다. 따라서 개발된 pre-plating 방법은 근육 위성세포와 섬유아세포를 모두 확보할 수 있는 유용한 기술인 것으로 판단된다. 특히, PAX7⁺ 위성세포의 분화 조절과 기질세포와의 상호작용이 근육 재생의 기능적 조절에 중요하다고 보고한 기존 연구와 비교할 때, 본 연구에서 확립된 CS 및 CF 집단의 분리 전략은 세포 유형별 기능적 특성 분석에 유용한 실험적 플랫폼을 제공할 것으로 사료된다(Yoshioka *et al.*, 2020).

2. PAX7, MYOD, VIM 및 PDGFA 유전자의 발현 분석

Fig. 6은 CS 및 CF 그룹의 유전자 발현 분석 결과로, 대표적인 근육세포 마커 (PAX7, MYOD1)와 섬유아세포 마커(VIM, PDGFA)의 발현 수준을 비교한 결과이다. 근육 위성세포 마커인 PAX7과 근육 분화 관련 전사인자인 MYOD1의 발현은 CS 그룹에서 CF 그룹에 비해 유의적으로 높게 나타났다 ($p<0.05$). 특히 MYOD1은 근육 분화 초기 단계에서 위성세포의 분화 개시를 조절하는 핵심 전사인자

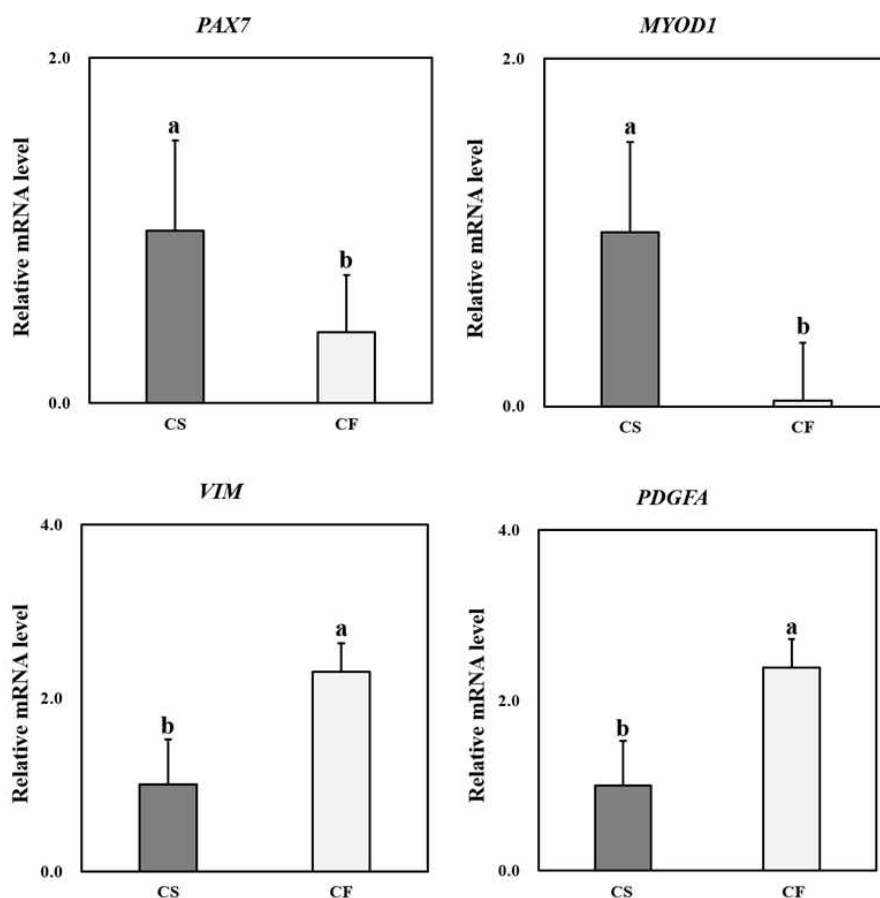


Fig. 6. mRNA expression levels of satellite cell markers in cultured cells under different preplating conditions. Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) analysis of PAX7, MYOD1, VIM, and PDGFA was performed after 3 days of culture. Gene expression levels were normalized to the GAPDH. CS: collagenase satellite cells; CF: collagenase fibroblasts. ^{a~b} Values are presented as mean + standard deviation. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

로 알려져 있으며, CS 그룹에서의 높은 발현은 근육 분화 잠재력이 유지되고 있음을 시사한다(Hindi *et al.*, 2013). 반면에 섬유아세포 마커인 VIM과 성장인자 관련 유전자인 PDGFA에서는 CF 그룹에서 CS 그룹에 비해 유의적으로 높게 나타났다($p < 0.05$). 이는 CF 그룹이 섬유아세포의 특성을 보다 강하게 나타내며, 세포외기질 형성 및 기질 리모델링 능력이 강화된 상태로 분리되었음을 의미한다. CS 그룹에서 PAX7과 MYOD1 발현이 동시에 높게 나타난 것은 위성세포의 자기 재생능과 근육 분화 잠재력을 보존하고 있음을 보여준다. 이러한 특성은 향후 근육 분화 기작 연구뿐만 아니라 세포 배양을 위한 근육세포 원료로서의 활용 가능성을 시사한다. 반면, CF 그룹은 섬유아세포가 세포외기질 형성 및 미세환경 조절에 기여하는 특성을 나타내어, 조직 재생 또는 세포 상호작용 연구를 위한 모델로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

IV. 요약

본 연구는 배양육 생산을 위한 근육 전구 세포의 순도 향상을 목적으로 pre-plating 기법을 적용하

여 근육 위성세포와 섬유아세포를 분리하고, 각 세포 집단의 특성을 비교·분석하기 위해 수행되었다. 한우 근육 조직으로부터 분리한 세포에 pre-plating 방법을 적용한 결과, 부착 속도에 따라 CS(근육 위성세포 풍부 집단)와 CF(섬유아세포 풍부 집단)를 확보할 수 있었다. 면역형광 염색 분석에서 CS 그룹은 PAX7 양성 핵의 수가 CF 그룹에 비해 유의적으로 높았으며, CF 그룹에서는 Vimentin 양성 세포가 우세하게 관찰되었다. 또한 유전자 발현 분석 결과, 근육 위성세포 및 분화 관련 마커인 PAX7 과 MYOD1의 발현은 CS 그룹에서 유의적으로 높게 나타난 반면, 섬유아세포 마커인 VIM과 PDGFA의 발현은 CF 그룹에서 유의적으로 증가하였다. 이러한 결과는 pre-plating 기법이 근육 위성세포와 섬유아세포를 효과적으로 분리할 수 있음을 보여주며, 본 연구에서 확보한 근육 위성세포 집단은 향후 배양육 생산을 위한 근육세포 원료로 활용 가능성이 있음을 시사한다.

V. 감사의 글

본 과제(결과물)는 2025년도 교육부 및 충청북도의 재원으로 충북RISE센터의 지원을 받아 수행된 지역혁신중심 대학지원체계(RISE)의 결과입니다(2025-RISE-11-014-03).

This research was supported by the Regional Innovation System & Education(RISE) program through the (Chungbuk Regional Innovation System & Education Center), funded by the Ministry of Education(MOE) and the (Chungcheongbuk-do), Republic of Korea.(2025-RISE-11-014-03).

VI. 참고문헌

1. Andreani G, Sogari G, Marti A, Frolidi F, Dagevos H, Martini D. 2023. Plant-based meat alternatives: Technological, nutritional, environmental, market, and social challenges and opportunities. *Nutrients* 15:452.
2. Gill M, Garnsworthy PC, Wilkinson JM. 2021. More effective linkages between science and policy are needed to minimize the negative environmental impacts of livestock production. *Animal* 15:100291.
3. Guan X, Zhou J, Du G, Chen J. 2022. Bioprocessing technology of muscle stem cells: Implications for cultured meat. *Trends Biotechnol* 40:721-734.
4. Hindi SM, Tajrishi MM, Kumar A. 2013. Signaling mechanisms in mammalian myoblast fusion. *Sci Signal* 6:re2.
5. Kleyn FJ, Ciacciariello M. 2021. Future demands of the poultry industry: Will we meet our commitments sustainably in developed and developing economies? *Worlds Poult Sci J* 77:267-278.
6. Lavasani M, Lu A, Thompson SD, Robbins PD, Huard J, Niedernhofer LJ. 2013. Isolation of muscle-derived stem/progenitor cells based on adhesion characteristics to collagen-coated surfaces. *Methods Mol Biol* 1035:53-65.
7. Lee JH, Kim TK, Kang MC, Park M, Choi YS. 2024. Methods to isolate muscle stem cells for cell-based cultured meat production: A review. *Animals* 14:819.
8. Li M, Wang D, Fang J, Lei Q, Yan Q, Zhou J, Guan X. 2022. An efficient and economical way to obtain porcine muscle stem cells for cultured meat production. *Food Res Int* 162:112206.
9. Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 25:402-408.
10. Melzener L, Schaeken L, Fros M, Messmer T, Raina D, Kiessling A, van Haaften T, Spaans S, Doğan A, Post M, Flack JE. 2024. Optimisation of cell fate determination for cultivated muscle

differentiation. *Commun Biol* 7:1493.

11. Warmate D, Onarinde BA. 2023. Food safety incidents in the red meat industry: A review of foodborne disease outbreaks linked to the consumption of red meat and its products, 1991 to 2021. *Int J Food Microbiol* 398:110240.
12. Yoshioka K, Kitajima Y, Okazaki N, Chiba K, Yonekura A, Ono Y. 2020. A modified pre-plating method for high-yield and high-purity muscle stem cell isolation from human/mouse skeletal muscle tissues. *Front Cell Dev Biol* 8:793.