



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0139720
(43) 공개일자 2024년09월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12N 5/0018 (2013.01)
C12N 2500/80 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0033762

(22) 출원일자 2023년03월15일
심사청구일자 2023년03월15일

(71) 출원인
계명대학교 산학협력단

대구광역시 달서구 달구벌대로 1095, 계명대학교 산학협력관 201호(신당동)

(72) 발명자
이승욱

대구광역시 수성구 청솔로 16, 108동 701호 (황금동, 힐스테이트 황금 엘포레)

윤현지

대구광역시 북구 공향로 84, 105동 1112호 (북현동, 북현우방타운)

(74) 대리인

특허법인태백

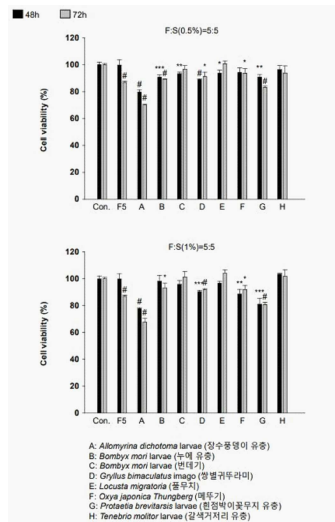
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 곤충 추출물을 포함하는 소태아 혈청 대체 조성물

(57) 요약

본 발명은 소태아 혈청(fetal bovine serum; FBS)을 대체하는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 세포 배양 시 곤충 추출물을 포함함으로써 고가이면서 윤리적 문제가 있는 소태아 혈청의 사용량을 줄이면서도 인간을 포함한 동물 유래의 다양한 세포 배양 시 소태아 혈청을 포함한 경우와 세포 생육에 미치는 영향이 동등하거나 그 이상의 세포 성장 촉진 효과가 확인됨에 따라, 상기 곤충 추출물을 포함하는 조성물은 소태아 혈청의 대체소재로 사용되며, 바이오분야에서의 세포 배양뿐만 아니라 배양육 및 이를 소재로 하는 다양한 식품 산업분야에 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711163565
과제번호	2020R1A2C1005339
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	지방세포 분화과정에서의 Nur77과 AMPK α 의 상호작용 규명 및 신규 항비만용 식의약
소재 개발	
기 여 율	1/1
과제수행기관명	계명대학교 산학협력단
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

곤충 추출물을 포함하는 세포 배양용 소태아 혈청 대체 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 곤충 추출물은 식용곤충, 탈지한 식용곤충 또는 이의 분쇄물을 물, C1 내지 C4의 알코올 또는 이의 수용액으로 추출되는 것을 특징으로 하는 소태아 혈청 대체 조성물.

청구항 3

청구항 2에 있어서,

상기 식용곤충은 갈색거저리 유충, 누에번데기, 쌍별귀뚜라미, 흰점박이꽃무지 유충, 장수풍뎅이 유충, 누에, 메뚜기 및 풀무치로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 소태아 혈청 대체 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 세포는 혈액암세포, 폐암세포, 전립선암세포, 위암세포, 유방암세포, 췌장암세포 및 대장암세포로 이루어진 군에서 선택된 암세포; 조골세포; 신장세포; 섬유모세포; 연골세포; 간세포; 신경세포; 면역세포; 근육세포; 및 줄기세포로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 소태아 혈청 대체 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 조성물은 세포의 계대배양이 가능한 것을 특징으로 하는 소태아 혈청 대체 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서,

상기 조성물은 소태아 혈청(fetal bovine serum; FBS), 곤충 단백질수분해물 또는 송아지 혈청(fetal calf serum; FCS)을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 소태아 혈청 대체 조성물.

청구항 7

청구항 6에 있어서,

상기 조성물은 곤충 추출물 10 내지 90 중량% 및 소태아혈청(FBS), 곤충 단백질수분해물 또는 송아지 혈청(fetal calf serum; FCS) 10 내지 90 중량%를 포함하는 것을 특징으로 하는 소태아 혈청 대체 조성물.

청구항 8

청구항 1 내지 청구항 7 중 어느 한 항에 따른 소태아 혈청 대체 조성물을 포함하는 세포 배양용 배지 조성물.

청구항 9

청구항 1 내지 청구항 7 중 어느 한 항에 따른 소태아 혈청 대체 조성물을 세포에 첨가하여 배양하는 단계를 포함하는 세포 배양방법.

청구항 10

곤충을 분쇄하여 물, C1 내지 C4의 알코올 또는 이의 수용액을 가해 진탕 추출하여 기질 용액으로 제조하는 제1 단계;

상기 기질 용액을 증탕시키는 제2단계;

상기 증탕시킨 기질 용액을 여과하거나 원심분리하여 여과액 또는 상등액을 얻는 제3단계; 및

상기 여과액 또는 상등액을 건조하여 곤충 추출물을 수득하는 제4단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 곤충 추출물의 제조방법.

청구항 11

청구항 10에 있어서,

상기 제1단계를 2 내지 5회 반복하여 추출하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 곤충 추출물의 제조 방법.

청구항 12

청구항 10에 있어서,

상기 제2단계는 70 내지 90℃에서 2 내지 12시간 동안 증탕시키는 것을 특징으로 하는 곤충 추출물의 제조방법.

청구항 13

청구항 10에 있어서,

상기 제3단계의 여과액 또는 상등액을 감압 농축하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 곤충 추출물의 제조방법.

청구항 14

청구항 10에 있어서,

상기 제4단계의 건조는 동결건조, 열풍건조, 진공건조, 자연건조 및 분무건조로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 곤충 추출물의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 곤충 추출물을 포함하는 소태아 혈청 대체 조성물을 제공한다.

배경 기술

[0002] 혈청은 여러 물질이 혼합된 복합 산물이며 세포 배양실에서 기본 배양 배지에 첨가제로 사용되며, 세포배양에 있어서 성장인자, 호르몬 그리고 세포를 자극하는 성분 등을 포함하고 있으며, 세포의 종류에 따라 다양하게 사용되고 있으나 일반적으로 소태아 혈청을 가장 많이 이용하고 있다. 소태아 혈청은 임신기간 중에 소 혈액으로부터 분리되는 혈청으로, 특히 바이오테크 관련 실험의 기초적인 단계에 속하는 동물세포 배양 뿐만 아니라 최근 몇 년 동안 전 세계적으로 기술속도가 점점 더 빨라지고 있는 백신, 단백질의약품, 치료용 항체 등 개발에 사용되는 원료물질이다.

[0003] 상기 소태아 혈청의 한국 시장은 약 200억원대이며, 전 세계 시장 크기는 약 2조원에 이른다. 이 중 미국산이 약 85%를 차지하고 호주와 뉴질랜드산이 약 15%를 이룬다. 한국에서 생산판매는 전무하며 수입금지 조치가 내려지면 대처할 수 있는 상황이 현재로서는 매우 미흡한 상황이다. 따라서, 소태아 혈청을 대체할 수 있는 다른 혈청의 개발에 대한 필요성이 크게 대두되고 있다.

[0004] 또한, 종래 소태아 혈청은 고가라는 문제도 있으나, 이보다 윤리적인 문제와 GRAS 등급(식품등급)에 맞는 혈청을 사용하고자 하는 요구로 인하여 소태아 혈청 대체제를 개발할 필요성이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 1. 대한민국 공개특허 제10-2021-0090560호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 곤충 추출물을 포함하는 세포 배양용 소태아 혈청 대체 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 소태아 혈청 대체 조성물을 포함하는 세포 배양용 배지 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 소태아 혈청 대체 조성물을 세포에 첨가하여 배양하는 단계를 포함하는 세포 배양방법을 제공하는 데에 있다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 곤충을 분쇄하여 물, C1 내지 C4의 알코올 또는 이의 수용액을 가해 진탕 추출하여 기질 용액으로 제조하는 제1단계; 상기 기질 용액을 중탕시키는 제2단계; 상기 중탕시킨 기질 용액을 여과하거나 원심분리하여 여과액 또는 상등액을 얻는 제3단계; 및 상기 여과액 또는 상등액을 건조하여 곤충 추출물을 수득하는 제4단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 곤충 추출물의 제조방법을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 곤충 추출물을 포함하는 세포 배양용 소태아 혈청 대체 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 소태아 혈청 대체 조성물을 포함하는 세포 배양용 배지 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 소태아 혈청 대체 조성물을 세포에 첨가하여 배양하는 단계를 포함하는 세포 배양방법을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 곤충을 분쇄하여 물, C1 내지 C4의 알코올 또는 이의 수용액을 가해 진탕 추출하여 기질 용액으로 제조하는 제1단계; 상기 기질 용액을 중탕시키는 제2단계; 상기 중탕시킨 기질용액을 여과하거나 원심분리하여 여과액 또는 상등액을 얻는 제3단계; 및 상기 여과액 또는 상등액을 건조하여 곤충 추출물을 수득하는 제4단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 곤충 추출물의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 따르면, 세포 배양시 곤충 추출물을 포함함으로써 고가이면서 윤리적 문제가 있는 소태아 혈청의 사용량을 줄이면서도 소태아 혈청만을 포함한 경우와 동등하거나 그 이상의 세포 성장 촉진 효과를 나타내어, 세포 배양시 필수적으로 사용되는 소태아 혈청의 대체소재로 사용될 뿐만 아니라, 배양육을 소재로 하는 다양한 식품 산업분야에 유용하게 활용될 수 있는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 피부각질세포인 HaCaT 세포를 대상으로 소태아 혈청과 곤충 추출물을 중량비 5:5로 하여 세포 생육도(cell viability)를 비교한 그래프이다,

도 2는 피부각질세포인 HaCaT 세포를 대상으로 소태아 혈청과 곤충 추출물을 중량비 3:7로 하여 세포 생육도(cell viability)를 비교한 그래프이다.

도 3은 피부각질세포인 HaCaT 세포를 대상으로 소태아 혈청과 곤충 추출물을 중량비 1:9로 하여 세포 생육도(cell viability)를 비교한 그래프이다.

도 4는 번데기 추출물(BMW)과 갈색거저리 유충 추출물(TMW) 세포 배양액을 이용하여 HaCaT 세포수를 계대 배양하면서 계대 배양 횟수에 따른 세포 수를 나타낸 그래프이다.

도 5는 세대별 세포 모양을 역상 위상차 현미경(Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)을 이용하여 100배 배율로 촬영한 결과이다.

도 6은 번데기 추출물(BMW)과 갈색거저리 유충 추출물(TMW) 세포 배양액을 이용한 세포주별 세포 생육도(cell viability)를 비교한 그래프이다.

도 7은 송아지 혈청(fetal calf serum; FCS)/곤충 추출물 혼합물 함유 배지를 이용한 HaCaT 세포의 배양 및 생육도(cell viability)를 비교한 그래프이다.

도 8은 곤충 단백질가수분해물/곤충 추출물 혼합액 함유 배지를 이용한 HaCaT 세포의 배양 및 생육도(cell viability)를 비교한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0018] 본 발명은 곤충 추출물을 포함하는 세포 배양용 소태아 혈청 대체 조성물을 제공한다.
- [0019] 상기 곤충 추출물은 식용곤충, 탈지한 식용곤충 또는 이의 분쇄물을 물, C1 내지 C4의 알코올 또는 이의 수용액으로 추출될 수 있다.
- [0020] 상기 식용곤충은 갈색거저리 유충, 누에번데기, 쌍별귀뚜라미, 흰점박이꽃무지 유충, 장수풍뎅이 유충, 누에, 메뚜기 및 풀무치로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0021] 상기 조성물은 세포의 계대배양이 가능할 수 있다.
- [0022] 본 발명에서 용어, “계대”는 세포를 건강한 상태로 지속적으로 장기간 배양하기 위해 세포의 대를 계속 이어서 배양하는 방법에서, 배양용기를 교체하는 것 또는 세포군을 나누어 배양하는 것을 의미한다. 한 차례 배양용기 교체 또는 세포군을 나누어 배양하는 것을 1 계대라고 한다. 본 발명에서 상기 계대는 세대와 혼용되어 사용될 수 있다.
- [0023] 상기 조성물은 소태아 혈청(fetal bovine serum; FBS), 곤충 단백질가수분해물 또는 송아지 혈청(fetal calf serum; FCS)을 추가로 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0024] 상기 조성물은 곤충 추출물 10 내지 90 중량% 및 소태아혈청(FBS), 곤충 단백질가수분해물 또는 송아지 혈청(fetal calf serum; FCS) 10 내지 90 중량%를 포함할 수 있다.
- [0026] 또한, 본 발명은 상기 소태아 혈청 대체 조성물을 포함하는 세포 배양용 배지 조성물을 제공한다.
- [0027] 본 발명에서 용어, “배지”는 인 비트로(in vitro)에서 세포의 성장, 생존 및 분화를 지지할 수 있게 하는 배지를 의미하고, 해당 분야에서 사용되는 줄기세포의 배양 및 분화에 적절한 통상의 배지를 모두 포함한다. 세포의 종류에 따라 해당 분야의 기술적 수준에서 배지의 종류와 배양 조건을 선택할 수 있다. 배양에 사용되는 배지는 구체적으로 세포 배양 최소 배지(cell culture minimum medium, CCMM)로, 일반적으로 탄소원, 질소원 및 미량 원소 성분을 포함한다. 상기 세포 배양 최소 배지에는 예를 들어, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM(Minimal essential Medium), BME(Basal Medium Eagle), RPMI1640, F-10, F-12, α -MEM(α -Minimal essential Medium), GMEM(Glasgow's Minimal essential Medium), Iscove's Modified Dulbecco's Medium 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 배지는 페니실린(penicillin), 스트렙토마이신(streptomycin), 겐타마이신(gentamicin) 또는 이들의 2 이상의 혼합물 등의 항생제를 포함할 수 있다.
- [0029] 또한, 본 발명은 상기 소태아 혈청 대체 조성물을 세포에 첨가하여 배양하는 단계를 포함하는 세포 배양방법을 제공한다.
- [0031] 또한, 본 발명은 곤충을 분쇄하여 물, C1 내지 C4의 알코올 또는 이의 수용액을 가해 진탕 추출하여 기질 용액으로 제조하는 제1단계; 상기 기질 용액을 중탕시키는 제2단계; 상기 중탕시킨 기질용액을 여과하거나 원심분리

하여 여과액 또는 상등액을 얻는 제3단계; 및 상기 여과액 또는 상등액을 건조하여 곤충 추출물을 수득하는 제4 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 곤충 추출물의 제조방법을 제공한다.

[0032] 상기 제1단계를 2 내지 5회 반복하여 추출하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0033] 상기 제2단계는 70 내지 90℃에서 2 내지 12시간 동안 중탕시킬 수 있다.

[0034] 상기 제3단계의 여과액 또는 상등액을 감압 농축하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0035] 상기 제4단계의 건조는 동결건조, 열풍건조, 진공건조, 자연건조 및 분무건조로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0037] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예 등을 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예 등은 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예 등에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예 등은 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0039] <실시예 1> 곤충 추출물 세포 배양액의 제조방법

[0040] 곤충을 분쇄하여 증류수를 1:9 비율의(w/v) 기질 용액으로 제조한 후, 80℃에서 3시간 동안 2회 추출하였다. 그 후, 환류 추출물을 13,000xg에서 20분 동안 원심분리하여 상등액을 얻었으며 이를 72시간 동안 동결 건조하여 최종적으로 곤충 환류 추출물을 얻었다.

[0042] <실험예 1> 곤충 추출물 세포 배양액의 비율별 HaCaT 세포 생육도 비교

[0043] 인간 각질 형성세포(keratinocyte)인 HaCaT 세포주는 한국세포주은행에서 분양받아 사용하였다. DMEM 배지(Dulbeccos modified Eagles medium high glucose)에 10% 소태아 혈청(이하 FBS라 함.) 및 1% 항생제인 페니실린(penicillin) 및 스트렙토마이신(streptomycin)을 첨가하여 배양 배지로 사용하고, 5% CO₂ 및 37℃ 인큐베이터에서 세포를 배양하였다. 곤충 추출물을 함유하는 세포 배양액이 세포 배양에 적합한지 확인하고자, 다양한 비율로 FBS 또는 FBS/곤충 추출물 혼합액을 첨가하여 배지를 제조하였다. 10% FBS를 단독으로 사용한 배지를 대조군으로 하여 FBS와 0.5% 또는 1% 곤충 추출물 용액을 5:5, 3:7 및 1:9 비율로 섞은 혼합물을 DMEM 배지에 최종 10% 비율(v/v)이 되도록 제조하였다.

[0044] 배양된 세포에 트립신을 처리하여 수집하고 3x10⁴ cells/well 밀도로 48-웰에 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 그 후 배양액을 제거하고 FBS 또는 각 혼합물을 함유하는 배지로 교체하여 44 또는 68시간 동안 추가 배양한 후, WST-8(BIOMAX, 서울, 한국) 용액을 20μl 처리하여 총 48 내지 72시간 동안 배양하였다. 그 후 마이크로플레이트 셰이커를 이용하여 5분간 잘 섞어준 후 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 곤충 추출물의 FBS 대체효과를 알아보기 위해 FBS와 곤충 추출물을 다양한 비율로 섞어 배지를 제조한 후 인간 피부각질세포인 HaCaT 세포를 대상으로 배지별 세포 생육도(cell viability)를 비교하여 도 1 내지 도 3에 나타내었다. 도 1 내지 도 3을 참고하면, FBS와 곤충(갈색거저리 유충, 풀무치, 누에번데기) 추출물을 증류수로 1% 희석하여 3:7의 비율로 첨가하여 제조한 배지가 48 내지 72시간 동안 배양하는 동안 세포 생육에 미치는 영향이 없는 최적의 대체배지 조성물로 확인되었다.

[0046] <실험예 2> 번데기 추출물(BMW)과 갈색거저리 유충 추출물(TMW) 세포 배양액을 이용한 HaCaT 세포의 배양

[0047] 세포 배양에 있어 FBS/번데기 추출(이하 BMW라 함.) 혼합물과 FBS/갈색거저리 유충 추출물(이하 TMW라 함.) 혼합액의 FBS 대체 가능성을 추가적으로 평가하기 위해 HaCaT 세포를 10세대 장기 계대배양하면서 각각의 세대마다 세포 수를 측정함으로써 세포 증식에 미치는 영향을 관찰하였다. 10% FBS를 단독으로 사용한 배지를 대조군으로 하여 FBS와 1% BMW, FBS와 1% TMW를 각각 3:7 비율로 섞은 혼합물을 DMEM 배지에 최종 10% 비율(v/v)이 되도록 제조하였다. 각각의 배지로 세대별 세포를 100파이 디쉬에 1x10⁶ cells/dish의 밀도로 분주하고 48시간 동안 배양한 후, 트립신을 이용하여 세포를 수거하였다. 그 후, 0.4% 트립판블루 시약을 이용하여 세포를 염색하고 헤모사이토미터를 이용하여 염색되지 않은 살아있는 세포의 수를 측정하여 도 4에 나타내었다.

[0048] 또한, 세대별 세포 모양은 역상 위상차 현미경(Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)을 이용하여 100배 배율로 촬영하여 도 5에 나타내었다. HaCaT 세포를 대상으로 연속적인 계대배양을 10회 진행하며 계대배양 횟수에 따라 세포 생육도에 미치는 영향을 조사함으로써 FBS/번데기 추출물(BMW)과 FBS/갈색거저리 유충 추출물(TMW)의 FBS 대체 효과를 추가적으로 확인하였다. 도 4를 참조하면, 10회의 계대배양 동안 FBS 대비 세포 생육도에 미치는 영향이 없거나 크지 않은 것으로 나타나 여러 번의 계대배양을 진행하는 중에도 FBS 대체효과가 우수한 것으로 확인되었다. 또한 도 5를 참조하면, 각각 1회, 5회 및 10회 계대배양된 세포의 모습을 관찰한 결과 10회에 걸친 계대배양을 진행하는 동안에도 세 그룹 모두 세포 모양에 유의적인 차이를 보이지 않음을 알 수 있었다.

[0050] <실험예 3> 번데기 추출물(BMW)과 갈색거저리 유충 추출물(TMW) 세포 배양액을 이용한 세포주별 세포 생육도의 비교

[0051] 마우스 근아세포인 C2C12(ATCC, Manassas, VA, USA), 래트 근아세포인 L6(ATCC, Manassas, VA, USA), 인간 유래 고형암 세포주인 H460(한국세포주은행, 서울, 한국), 인간 췌장암 세포주인 Panc-1(한국세포주은행, 서울, 한국), 인간 유래 혈액암 세포주인 HL-60(한국세포주은행, 서울, 한국), Jurkat(한국세포주은행, 서울, 한국) 중 HL-60, Jurkat은 RPMI1640 배지(Roswell Park Memorial Institute)에 10% FBS 및 1% 항생제인 페니실린 및 스트렙토마이신을 첨가하여 배양 배지로 사용하고, 그 외의 세포주는 DMEM 배지(Dulbeccos Modified Eagles Medium high glucose)에 10% FBS 및 1% 항생제인 페니실린 및 스트렙토마이신을 첨가하여 배양 배지로 사용하여 5% CO₂ 및 37℃ 인큐베이터에서 세포를 배양하였다. 다양한 세포들을 대상으로 FBS/번데기 추출물(BMW) 및 FBS/갈색거저리 유충 추출물(TMW)의 FBS 대체 효과를 확인하고자, 10% FBS를 단독으로 사용한 배지를 대조군으로 하여 FBS와 BMW(1%) 또는 TMW(1%)를 3:7 비율로 섞은 혼합액을 배지에 최종 10% 비율(v/v)이 되도록 제조하였다. 배양된 세포에 트립신을 이용하여 세포를 수집하고 C2C12 1×10⁴ cells/well, L6 1×10⁴ cells/well, H460 2×10⁴ cells/well, Panc-1 3×10⁴ cells/well, HL-60 1×10⁵ cells/well, Jurkat 1×10⁵ cells/well의 밀도로 48-웰에 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 그 후, 배양액을 제거하고 FBS 또는 각 혼합물을 함유하는 배지로 교체하여 44 또는 68시간 동안 추가 배양한 후, WST-8(BIOMAX, 서울, 한국) 용액을 20 μL 처리하여 총 48 내지 72시간 동안 배양하였다. 그 후 마이크로플레이트 웨이커를 이용하여 5분간 잘 섞어준 후 450nm에서 흡광도를 측정하였다. HaCaT 세포를 대상으로 한 실험에서 FBS 대체효과가 뛰어났던 BMW 및 TMW를 이용하여 인간 및 설치류 유래 다양한 세포들의 배양에 있어 이들의 FBS 대체 가능성을 확인하였다. 실험에는 C2C12 마우스 근아세포(myoblast), 인간 유래 고형암 세포주인 H460과 Panc-1, 인간 유래 혈액암 세포주인 HL-60, Jurkat 세포가 사용되었다. 각각의 배지로 48시간 배양한 결과를 도 6에 나타내었다.

[0052] 도 6을 참조하면, BMW 및 TMW 모두 C2C12 세포와 Panc-1 세포에서는 FBS 대비 세포 생육이 조금 저하되는 것으로 나타났으나 그 외 세포들의 배양에서는 큰 영향이 없었다. 따라서, BMW 및 TMW가 다양한 세포들의 배양에 있어 FBS 대체소재로 활용이 가능하며, 부착형 세포 뿐만 아니라 부유형 세포들의 배양에도 활용이 가능할 수 있음을 확인하였다.

[0054] <실험예 4> 송아지 혈청(fetal calf serum; FCS)/곤충 추출물 혼합물 함유 배지를 이용한 HaCaT 세포의 배양 및 생육도 확인

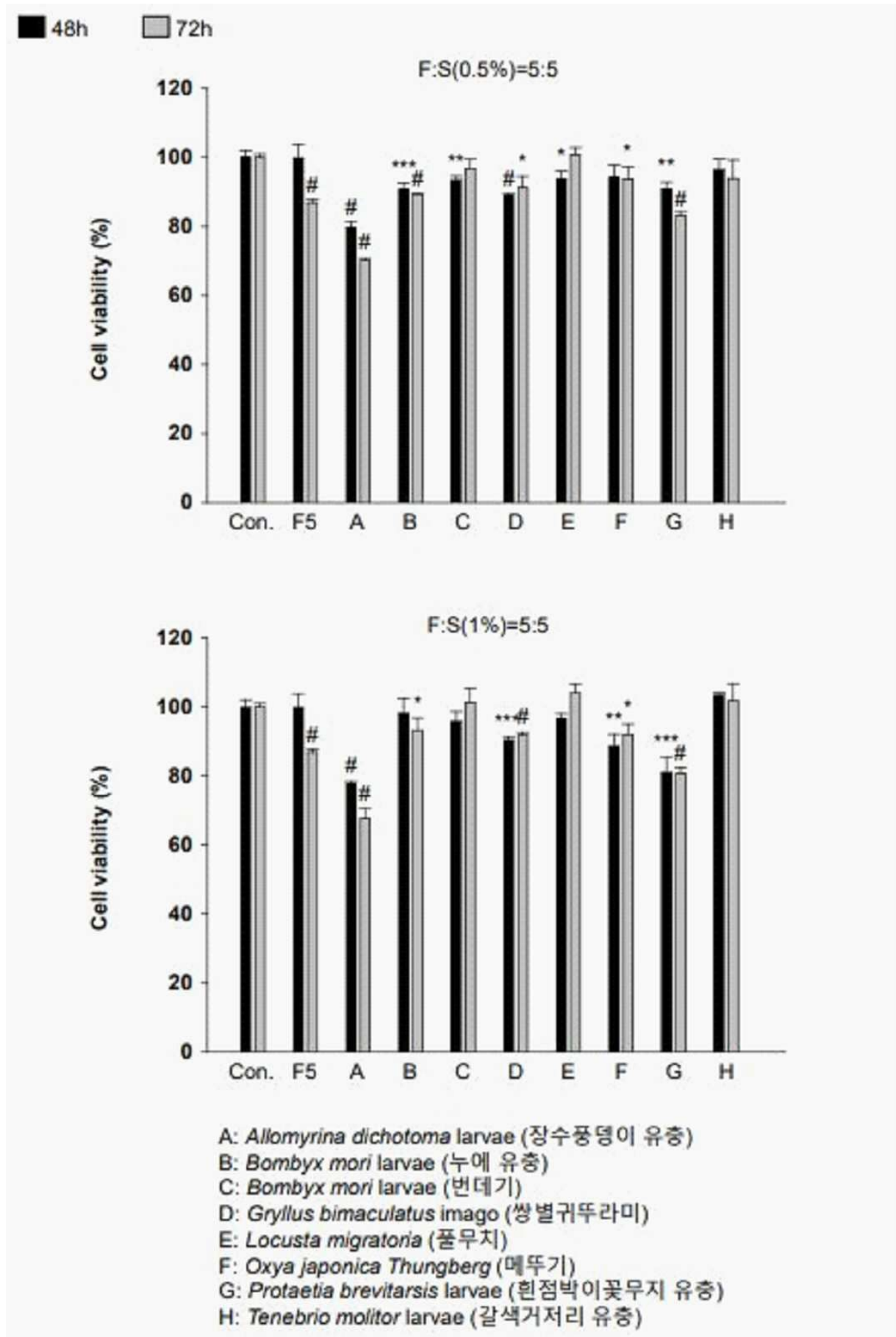
[0055] FCS/BMW 또는 FCS/TMW 혼합물의 완전한 FBS 대체 가능성을 확인하기 위해, 10% FBS를 단독으로 사용한 배지를 대조군으로 하여 FCS와 BMW(1%) 또는 TMW(1%)를 5:5와 3:7의 비율로 섞은 혼합물을 DMEM 배지에 최종 10% 비율(v/v)이 되도록 제조하였다. 배양된 세포에 트립신을 처리하여 수집하고 3×10⁴ cells/well 밀도로 48-웰에 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 그 후 배양액을 제거하고 FBS 또는 각 혼합물을 함유하는 배지로 교체하여 44 또는 68시간 동안 추가 배양한 후, WST-8(BIOMAX, 서울, 한국) 용액을 20 μL 처리하여 총 48 내지 72시간 동안 배양하였다. 그 후 마이크로플레이트 웨이커를 이용하여 5분간 잘 섞어준 후 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0056] 도 7은 인간 피부각질세포인 HaCaT 세포를 대상으로 FCS와 BMW 또는 TMW를 다양한 비율로 혼합한 배지별 세포 생육도를 비교한 그래프이다. 그 결과, FCS와 BMW(1%) 또는 TMW(1%)를 각각 5:5 또는 3:7 비율로 첨가하여 제조한 배지로 배양한 세포의 경우 FBS를 첨가하여 제조한 배지로 배양한 세포와 비교하여 48 내지 72시간 동안 세포 생육에 큰 차이를 보이지 않았다. 이를 통해, FCS/곤충 추출물 혼합물 또한 FBS 대체제로 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

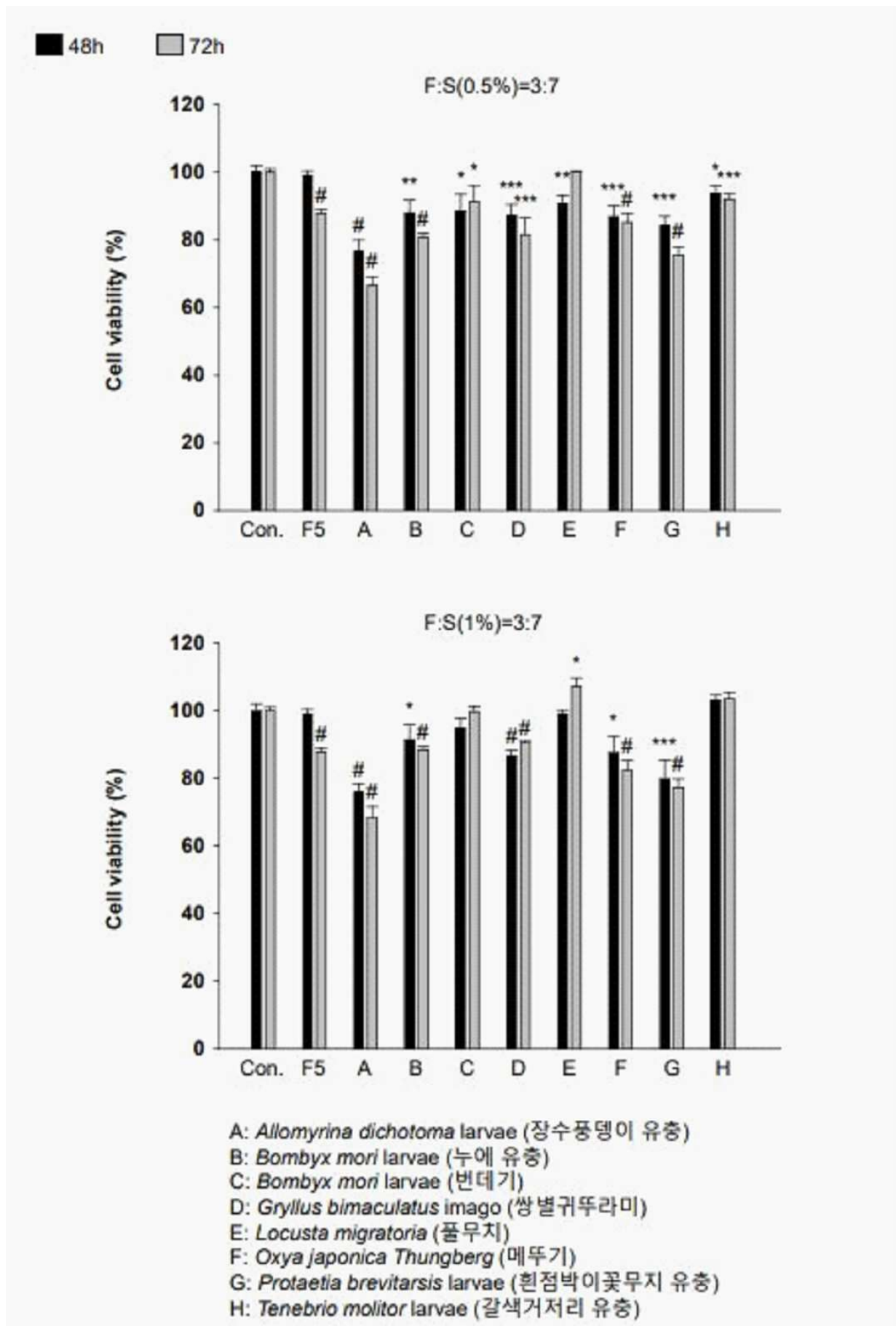
- [0058] <실험예 6> 곤충 단백질가수분해물/곤충 추출물 혼합액 함유 배지를 이용한 HaCaT 세포의 배양 및 생육도 확인
- [0059] 곤충 단백질가수분해물/곤충 환류 추출물 혼합 함유 세포 배양액이 세포 배양에 적합한지 확인하고자, 다양한 비율로 FBS 또는 FBS/곤충 단백질가수분해물/곤충 환류 추출물 혼합 배지를 제조하였다. 10% FBS를 단독으로 사용한 FBS 10%를 대조군으로 하여 곤충 단백질가수분해물(0.5%)와 곤충 추출물(1%)을 1:1로 섞은 혼합액을 FBS와 각각 5:5, 3:7 및 1:9 비율로 섞어 DMEM 배지에 최종 10% 비율(v/v)이 되도록 제조하였다. 배양된 세포에 트립신을 처리하여 수집하고 3×10^4 cells/well 밀도로 48-웰에 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 그 후 배양액을 제거하고 FBS 또는 각 혼합물을 함유하는 배지로 교체하여 44 또는 68시간 동안 추가 배양한 후, WST-8(BIOMAX, 서울, 한국) 용액을 $20 \mu\text{l}$ 처리하여 총 48 내지 72시간 동안 배양하였다. 그 후 마이크로플레이트 셰이커를 이용하여 5분간 잘 섞어준 후 450nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [0060] 도 8은 인간 피부각질세포인 HaCaT 세포를 대상으로 FBS와 곤충 단백질가수분해물과 곤충 추출물을 다양한 비율로 혼합한 배지별 세포 생육도를 비교한 그래프이다. FBS와 비교해본 결과, 48시간에서 곤충 단백질가수분해물과 곤충 추출물 혼합액을 첨가한 배지의 생육도가 더 높은 것을 확인할 수 있으며, 72시간에서는 FBS와 비슷한 생육도를 보였다. 즉, 곤충 단백질가수분해물/곤충 환류 추출물 혼합 함유 세포 배지 또한 FBS 대체제로 사용될 수 있음을 알 수 있으며, 혼합액을 사용할 시 FBS를 90%까지 대체 가능한 것을 알 수 있었다.
- [0062] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.
- [0063] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

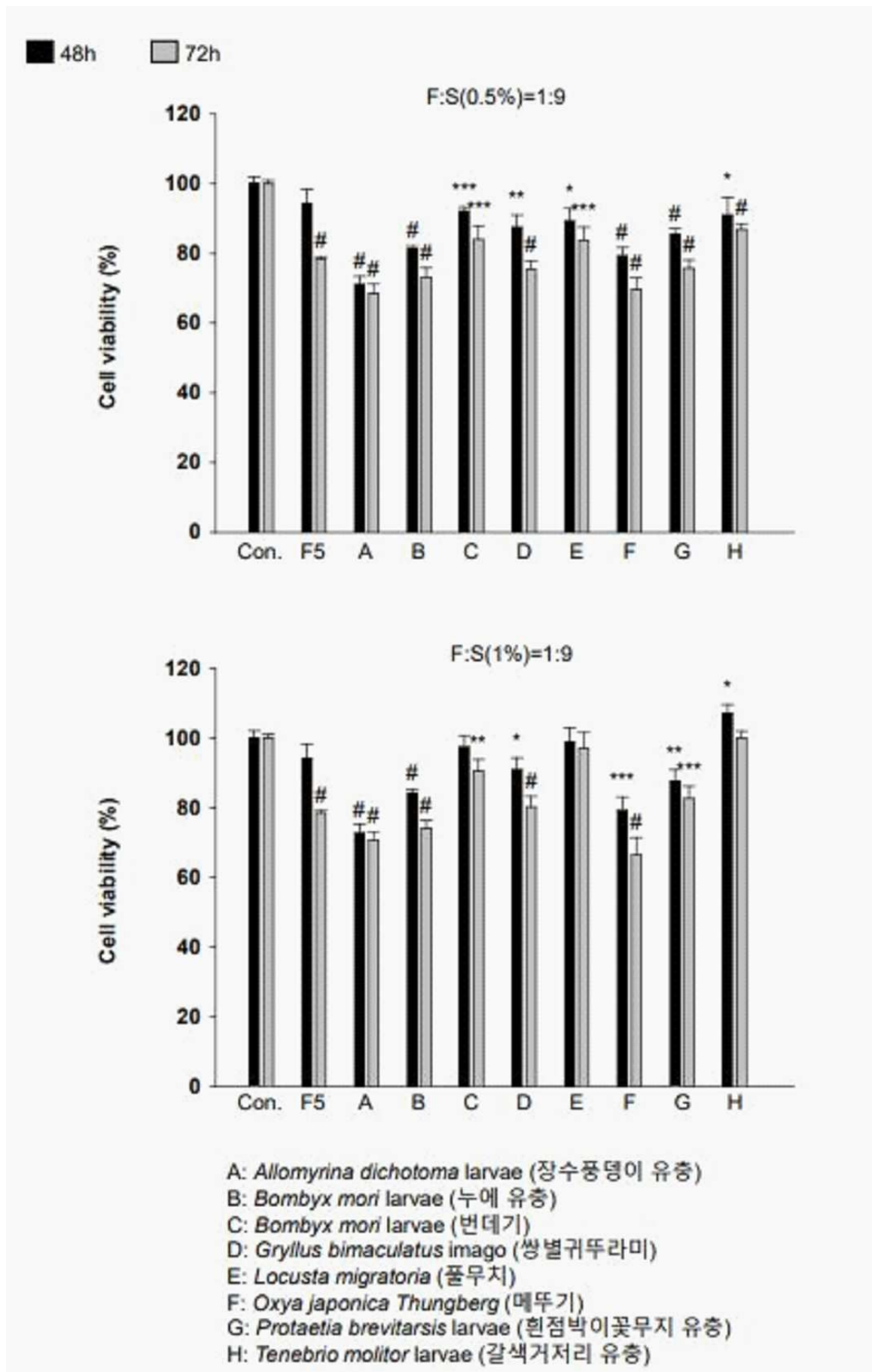
도면1



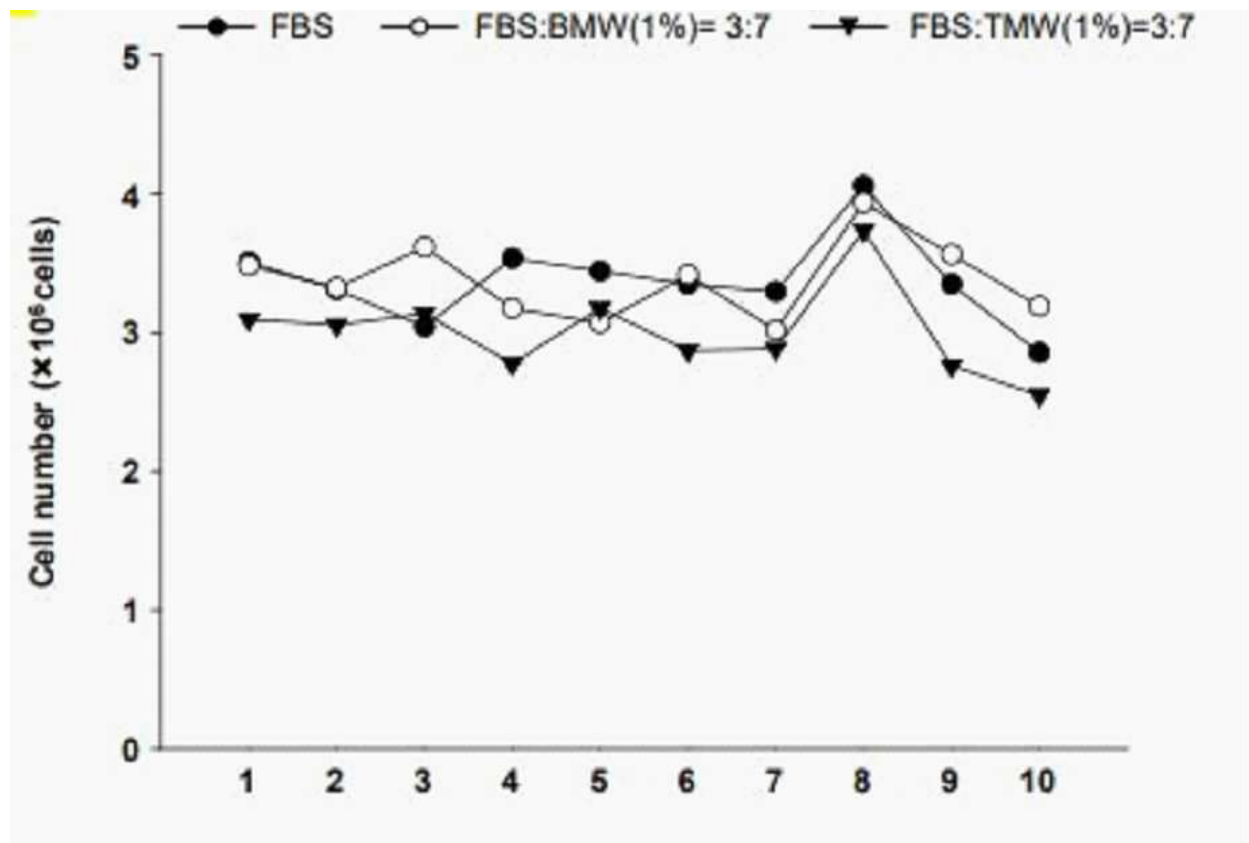
도면2



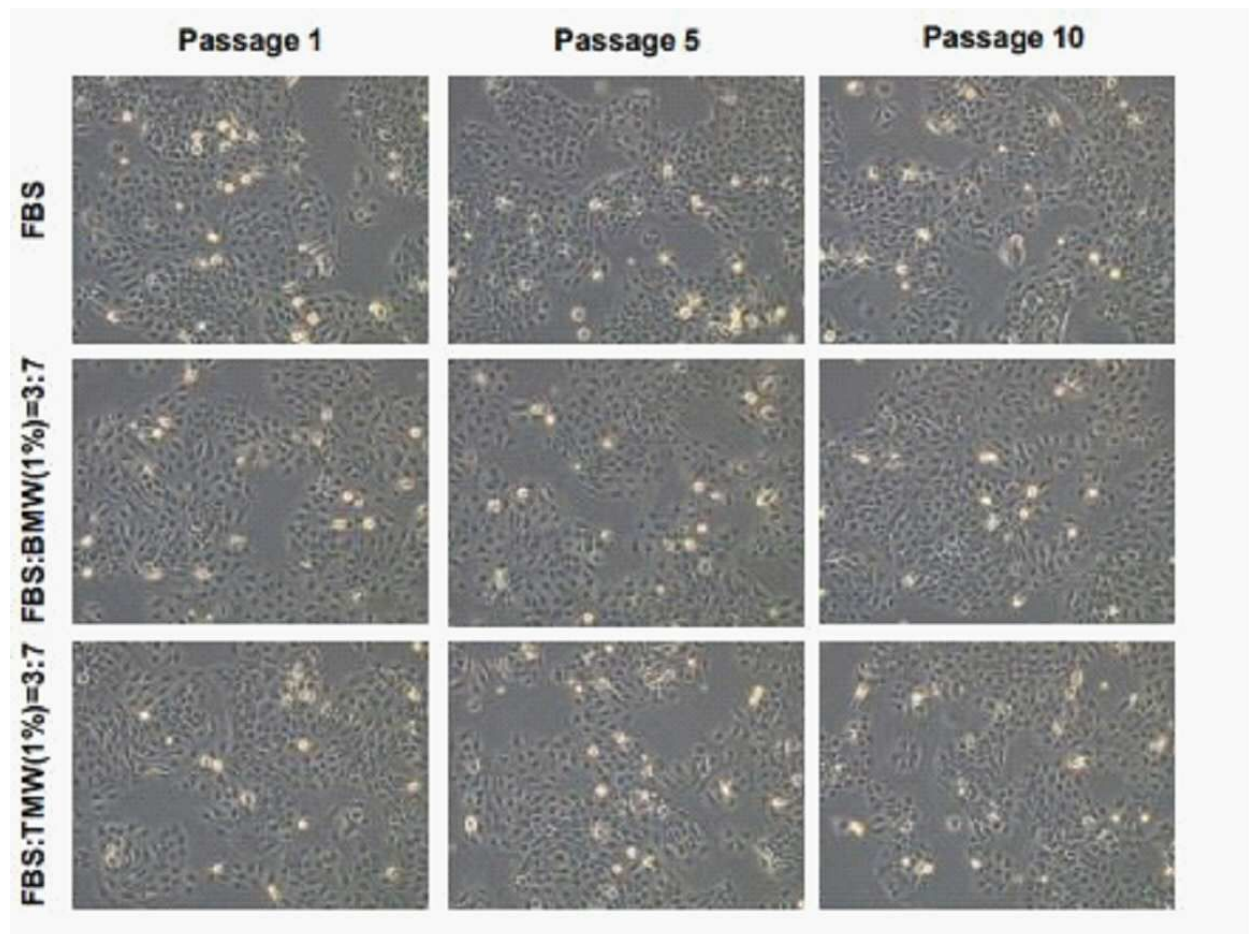
도면3



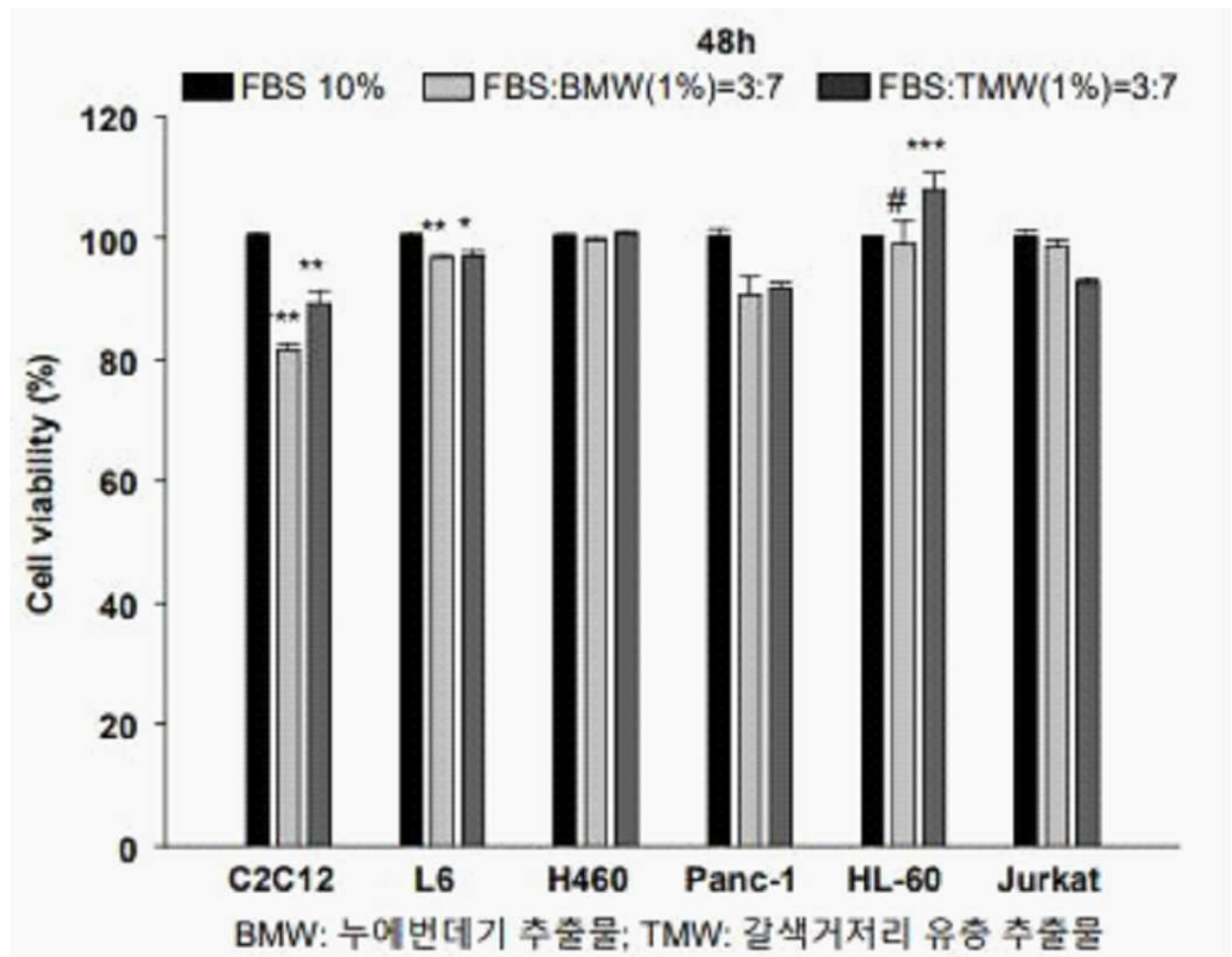
도면4



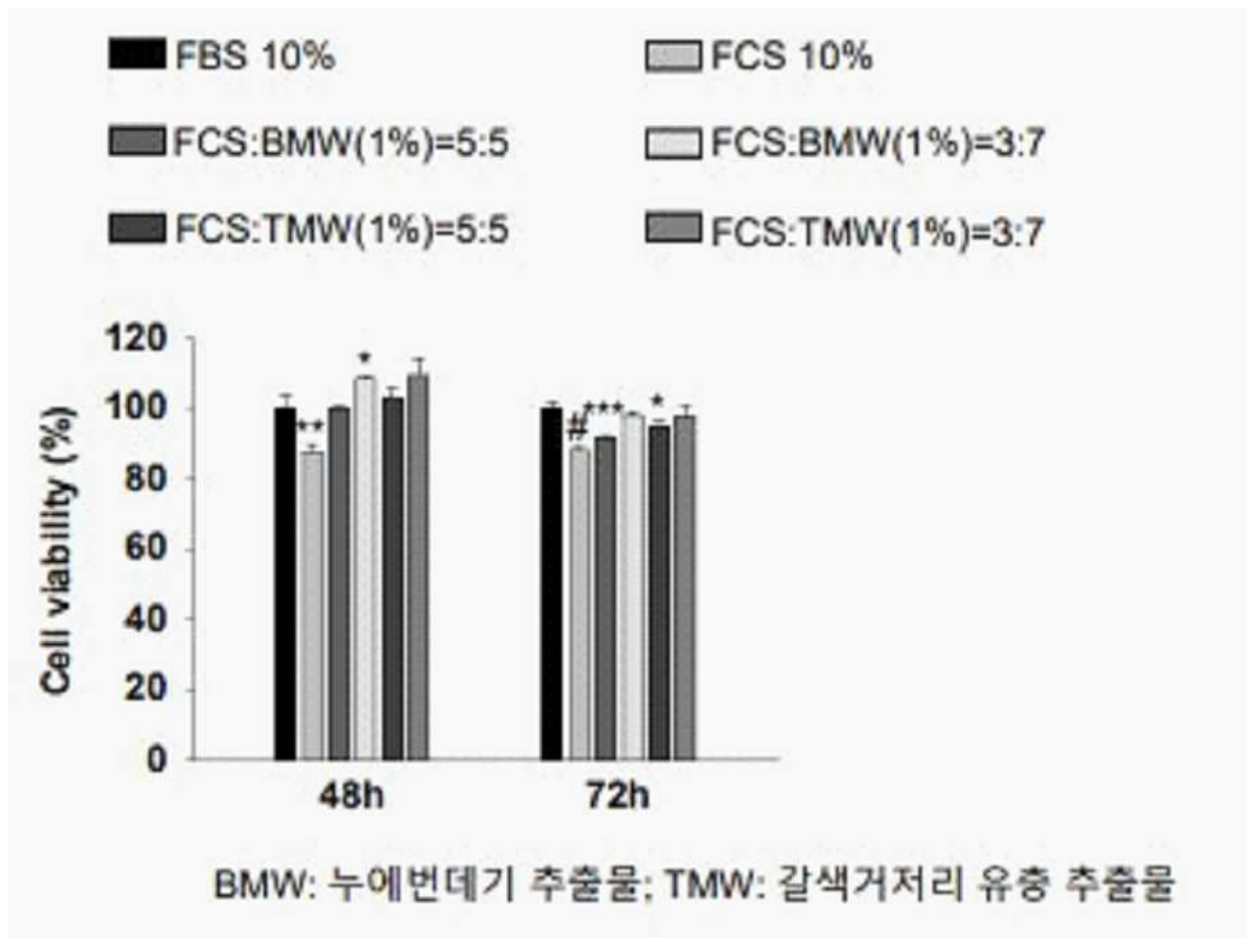
도면5



도면6



도면7



도면8

