



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0084331
(43) 공개일자 2025년06월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/077 (2010.01) A23L 13/00 (2016.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0658 (2013.01)
A23L 13/00 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2023-0172367
(22) 출원일자 2023년12월01일
심사청구일자 2023년12월01일

(71) 출원인
한화솔루션 주식회사
서울특별시 중구 청계천로 86, 22층 IP팀 (장교동)
(72) 발명자
김형택
서울특별시 중구 청계천로 86 (장교동)
이은지
서울특별시 중구 청계천로 86 (장교동)
(74) 대리인
특허법인지평

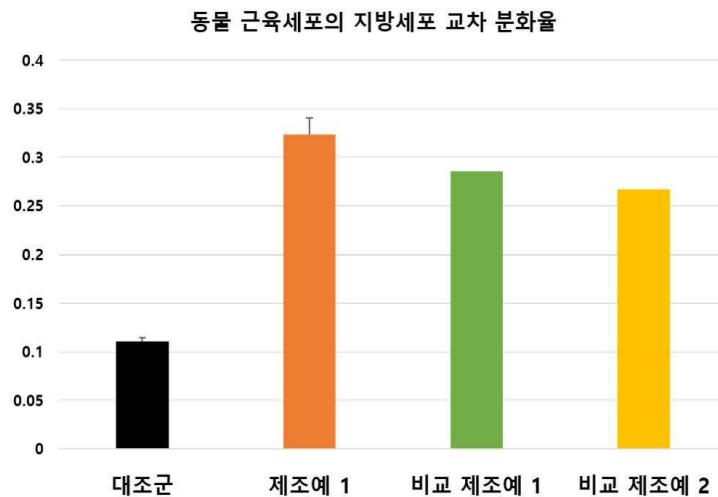
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 배양육 배양용 배지 첨가제, 이를 포함하는 배양육 배양용 세포 배양 배지 및 이를 이용한 배양육의 배양방법

(57) 요약

본 발명은 미세조류 추출물을 배양육 배양용 배지 첨가제로 활용한 발명에 관한 것으로서, 좀 더 구체적으로 설명하면, 미세조류 일종인 클로렐라의 추출물을 배지 첨가제 성분으로 사용함으로써, 근육 줄기세포로부터 지방 세포로의 교차 분화를 효과적으로 유도할 수 있으며, 근내 지방이 동시에 존재하는 세포를 유도하여 풍미가 개선된 배양육을 제공할 수 있다. 또한, 본 발명의 배지 첨가제를 사용함으로써, 배양육 배양 배지 성분인 소태아혈청을 대체하거나 소태아혈청과 혼용 사용함으로써, 값비싼 소태아혈청 사용을 줄이고, 배양육의 배양 효과를 증대시킴으로써, 가격 경쟁력이 우수한 배양육을 제공할 수 있는 발명이다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

C12N 5/0653 (2013.01)
C12N 2500/02 (2013.01)
C12N 2500/24 (2013.01)
C12N 2500/32 (2013.01)
C12N 2500/38 (2013.01)
C12N 2500/76 (2013.01)
C12N 2501/115 (2013.01)
C12N 2501/33 (2024.08)
C12N 2506/1323 (2013.01)

(72) 발명자

심민정

서울특별시 구로구 디지털로26길 61, 에이스하이엔
드타워 2차 1503호

박진희

서울특별시 중구 청계천로 86 (장교동)

명세서

청구범위

청구항 1

클로렐라 추출물을 포함하는, 배양육 배양용 배지 첨가제.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 클로렐라 추출물은,

클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*), 클로렐라 피레노이도사(*Chlorella pyrenidosa*), 클로렐라 레귤라리스(*Chlorella regularis*), 클로렐라 사코로필라(*Chlorella saccharophila*), 클로렐라 소로키니아나(*Chlorella sorokiniana*) 및 클로렐라 캡슐라타(*Chlorella capsulata*)로 중에서 선택된 1종 이상을 포함하는 클로렐라를 추출 공정을 수행하여 수득한 추출물인 것인, 배양육 배양용 배지 첨가제.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 추출물은 열수 추출물인, 배양육 배양용 배지 첨가제.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 열수 추출물은,

클로렐라 현탁액을 제조하는 1단계;

1단계의 현탁액을 초음파 처리하여 클로렐라 세포파쇄액을 제조하는 2단계;

상기 클로렐라 세포파쇄액을 환류추출 공정을 수행하여, 열수 추출물을 수득하는 3단계;

상기 열수 추출물을 염기로 처리한 후, 원심분리공정을 수행하여 상등액을 취한 다음, 상등액을 중화 처리하여 클로렐라 추출액을 수득하는 4단계; 및

상기 클로렐라 추출액을 건조시켜서 분말화된 클로렐라 추출물을 수득하는 5단계; 를 포함하는 공정을 수행하여 제조한, 배양육 배양용 배지 첨가제.

청구항 5

제1항의 배지 첨가제를 포함하는, 배양육 배양용 세포 배양 배지.

청구항 6

제5항에 있어서, 기초배지 및 상기 배지 첨가제를 포함하는 무혈청배지;이거나, 또는

기초배지, 소태아혈청(FBS) 및 상기 배지 첨가제를 포함하는 혈청배지;인, 배양육 배양용 세포 배양 배지.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 무혈청 배지 또는 혈청배지의 상기 기초배지는,

DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), 겐그로(GenGro) 배지, DMEM/F-12 배지, 레이보비츠 L-15(Leibovitz's L-15) 배지, IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Medium), 맥코이즈 5A(McCoy's 5A) 배지, M199 배지, MEM(Minimum Essential Medium Eagle), α -MEM(Minimum Essential Medium Eagle, Alpha), 햄스 F-10 배지(Ham's F-10 Nutrient Mixture), 햄스 F-12 배지(Ham's F-12 Nutrient Mixture), RPMI1640 배지, BME(Basal Media Eagle), CMRL1066 배지, 피셔배지(Fischer's Medium), 웨이마우스 MB752/1 배지(Waymouth MB752/1 Medium), MCDB 배지 및 WME(Williams' Medium E) 중에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 배양육 배양용 세포 배양 배지.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 기초배지는 인슐린(Insulin), 트랜스페린(Transferrin), 소디움세레나이트(Sodium selenite), FGF-2(Fibroblast growth factor), EGF(Epidermal Growth Factor), TGF β 3(Transforming growth factor), APS(1-ascorbate-2-phosphate trisodium salt), PDGF-BB(Platelet Derived Growth Factor) 및 HGF(Hepatocyte Growth Factor, recombinant) 중에서 선택된 1종 이상을 더 포함하는, 배양육 배양용 세포 배양 배지.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 배지 첨가제는 클로렐라 추출물 외에,

포스포디에스테라아제 억제제(phosphodiesterase inhibitor), 인슐린(insulin), 합성 글루코코티코이드(glucocorticoid) 티아졸리디네디온(thiazolidinedione), 레시틴(lecithin), 항생제, 글루타민(Glutamine), 아미노산(Amino acid) 및 비타민(Vitamins) 중에서 선택된 1종 이상을 더 포함하는, 배양육 배양용 세포 배양 배지.

청구항 10

제6항에 있어서, 상기 배지 첨가제는, 세포 배양 배지 1L당 클로렐라 추출물을 0.001 ~ 0.500 g/L 로 포함하는, 배양육 배양용 세포 배양 배지.

청구항 11

제10항에 있어서, 세포 배양 배지 1L당 포스포디에스테라아제 억제제 11.2 ~ 112.0 g/L, 인슐린 0.01 ~ 1.00 g/L, 합성 글루코티코이드 4.0 ~ 40.0 g/L, 티아졸리디네디온 3.6 ~ 36.0 g/L, 레시틴 0.012 ~ 0.120 g/L, 항생제, 글루타민 1.5 ~ 15.0 g/L, 아미노산 0.1 ~ 2.0 g/L 및 비타민(Vitamins) 0.05 ~ 5.00 g/L을 포함하는, 배양육 배양용 세포 배양 배지.

청구항 12

제5항 내지 제11항 중에서 선택된 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 배양 배지의 배양 대상은 근육 줄기세포인, 배양육 배양용 세포 배양 배지.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 근육 줄기세포는 동물 근육 줄기세포인, 배양육 배양용 세포 배양 배지.

청구항 14

제5항 내지 제11항 중에서 선택된 어느 한 항의 상기 세포 배양 배지를 이용한 배양육 배양 방법으로서, 동물 근육 줄기 세포를 지방세포로 교차분화시키는 세포 배양 공정을 수행하는, 배양육의 배양방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 배양육 배양은, 온도 37 ~ 41℃ 및 5.0 ~ 10.0% CO₂ 분위기의 배양기 내에서 배양을 수행하는, 배양육의 배양방법.

청구항 16

제14항에 있어서, 상기 교차분화 효율 증대율은 하기 방정식 1을 만족하는, 배양육의 배양방법.

[방정식 1]

$$2.0\% \leq (B-A)/B \times 100\% \leq 15.0\%$$

방정식 1에서, A와 B는 세포배양배지에서 근육줄기세포를 배양시, 근육줄기세포의 지방세포로의 교차분화율을 의미하며, A는 클로렐라 추출물 미함유 세포배양배지를 이용하여 배양한 지방세포로의 교차분화율이고, B는 클로렐라 추출물 함유 세포 배양 배지를 이용하여 배양한 지방세포로의 교차분화율이다.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 미세조류 일종인 클로렐라의 추출물을 포함하는 배지 첨가제, 이를 포함하는 배양육용 세포 배양 배지 및 이를 이용한 배양육의 배양 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 배양육은 가축을 사육하는 과정을 거치지 않고, 연구실에서 살아 있는 동물의 세포를 배양하여 세포공학기술로 세포증식을 통해 얻게 되는 식용고기를 의미한다. 시험관에서 키운다는 의미로 in vitro meat 또는 lab-grown meat, 천연이 아닌 인간이 줄기세포를 이용하여 합성한다는 의미에서 인공육(artificial meat), 전통적인 사육 시설이 아닌 청정한 생산시설에서 생산된다는 의미로 클린미트(clean meat), 배양육을 이루는 근섬유를 배양한다는 의미에서 바이오 인공근육(bio-artificial muscles: BAMs)이라고도 불린다.

[0004] 배양육은 실제 육류의 식감을 구현하기 위하여 줄기세포로부터 근육 조직이 형성될 때까지 세포를 성숙시켜 제조하기 때문에 오랜 시간이 소요되어 배양육 생산 비용이 매우 높아 상용화되기에는 현실의 벽이 여전히 높다.

[0005] 특히, 세포 대량 증식 과정에 많은 양의 배양액이 사용되는데, 현재 배양육 제조를 위한 배양액은 세포 성장에 필수적인 다양한 성장인자, 사이토카인, 각종 호르몬 및 단백질 등이 함유된 고가의 소태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS)을 포함하는데, FBS는 배양육 총 생산비용에서 매우 큰 비중을 차지하는 있어서, 배양육의 상업성, 대중화에 큰 벽으로 작용하고 있는 실정이다.

[0006] 또한, 세포성장을 위해 기초배지에 첨가제로 주로 사용되는 물질인 소태아 혈청은 살아있는 송아지의 혈액에서 채취를 하기 때문에 안정적인 생산이 어렵고, 어린 생명을 빼앗는 윤리적인 문제가 있다. 그리고 소의 도축량이 정해져 있어 생산량이 정해져 있기 때문에 단가 또한 매우 높기 때문에 배양육에 사용하기에는 적합하지 않은 문제가 있다.

[0007] 이에, 배양육 배양에 사용되는 배양배지 내 FBS를 대체하거나, 혼용 사용함으로써, 비용이 낮은 배양육 배양 배지에 대한 연구 및 제품 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0009] (특허문헌 0001) 한국 공개특허번호 제10-2022-0135628호(공개일 2022.10.07)
(특허문헌 0002) 한국 공개특허번호 제10-2023-0077644호(공개일 2023.06.01)

비특허문헌

- [0010] (비특허문헌 0001) The effects of hot water extract from *Chlorella vulgaris* is on the IEC-6 cells' proliferation(저자:Seo-HyeonSong, Department of Food and Life Science, Graduate School,Pukyong National University, 2011년 2월 25일)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명은 클로렐라 추출물이 근육세포에서 지방세포 혹은 지방 유사세포로의 전환분화력이 우수하고, 이 사용량 등을 조절함으로써, 배양육 배양을 조절할 수 있음을 알게 되어 본 발명을 완성하게 되었다. 즉, 본 발명은 클로렐라 추출물을 배양육 배양용 배지 첨가제, 배양육 배양용 배양배지 및 이를 이용한 배양육 배양 방법을 제공하고자 한다.
- [0012] 이에 본 발명의 해결하고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 기술적 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 다른 기술적 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명에 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해 될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0014] 상기 과제를 해결하기 위한 본 발명은 배양육 배양용 배지 첨가제에 관한 것으로서, 클로렐라 추출물을 포함한다.
- [0015] 본 발명의 바람직한 일실시예로서, 상기 클로렐라 추출물은, 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*), 클로렐라 피레노이도사(*Chlorella pyrenoidosa*), 클로렐라 레귤라리스(*Chlorella regularis*), 클로렐라 사코로필라(*Chlorella saccharophila*), 클로렐라 소로키니아나(*Chlorella sorokiniana*) 및 클로렐라 캡슐라타(*Chlorella capsulata*) 중에서 선택된 1종 이상을 포함하는 클로렐라를 추출공정을 수행하여 수득한 추출물이다.
- [0016] 본 발명의 바람직한 일실시예로서, 상기 추출물은 열수 추출물일 수 있다.
- [0017] 본 발명의 바람직한 일실시예로서, 상기 열수 추출물은, 클로렐라 현탁액을 제조하는 1단계; 1단계의 현탁액을 초음파 처리하여 클로렐라 세포파쇄액을 제조하는 2단계; 상기 클로렐라 세포파쇄액을 환류추출 공정을 수행하여 열수 추출물을 수득하는 3단계; 상기 열수 추출물을 염기로 처리한 후, 원심분리공정을 수행하여 상등액을 취한 다음, 상등액을 중화 처리하여 클로렐라 추출액을 수득하는 4단계; 및 상기 클로렐라 추출액을 건조시켜서 분말화된 클로렐라 추출물을 수득하는 5단계;를 포함하는 공정을 수행하여 제조한 것을 사용할 수 있다.
- [0019] 본 발명의 다른 목적은, 앞서 설명한 배지 첨가제를 포함하는 배양육 배양용 세포 배양 배지를 제공하는데 있다.
- [0020] 본 발명의 바람직한 일실시예로서, 본 발명의 배양육 배양용 세포 배양 배지는, 기초배지 및 상기 배지 첨가제를 포함하는 무혈청배지;이거나, 또는 기초배지, 소태아혈청(FBS) 및 상기 배지 첨가제를 포함하는 혈청배지;일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 바람직한 일실시예로서, 상기 무혈청배지 또는 혈청배지의 상기 기초배지는, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), 겐그로(GenGro) 배지, DMEM/F-12 배지, 레이보비츠 L-15(Leibovitz's L-15)

배지, IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Medium), 맥코이즈 5A(McCoy's 5A) 배지, M199 배지, MEM(Minimum Essential Medium Eagle), α -MEM(Minimum Essential Medium Eagle, Alpha), 햄스 F-10 배지(Ham's F-10 Nutrient Mixture), 햄스 F-12 배지(Ham's F-12 Nutrient Mixture), RPMI1640 배지, BME(Basal Media Eagle), CMRL1066 배지, 피셔배지(Fischer's Medium), 웨이마우스 MB752/1 배지(Waymouth MB752/1 Medium), MCDB 배지 및 WME(Williams' Medium E) 중에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0022] 본 발명의 바람직한 일실시예로서, 상기 기초배지는 인슐린(Insulin), 트랜스페린(Transferrin), 소디움세레나이트(Sodium selenite), FGF-2(Fibroblast growth factor), EGF(Epidermal Growth Factor), TGF β 3(Transforming growth factor), APS(1-ascorbate-2-phosphate trisodium salt), PDGF-BB(Platelet Derived Growth Factor) 및 HGF(Hepatocyte Growth Factor, recombinant) 중에서 선택된 1종 이상을 더 포함할 수 있다.

[0023] 본 발명의 바람직한 일실시예로서, 상기 배지 첨가제는 클로렐라 추출물 외에, 포스포디에스테라아제 억제제(phosphodiesterase inhibitor), 인슐린(insulin), 합성 글루코코티코이드(glucocorticoid) 티아졸리디네디온(thiazolidinedione), 레시틴(lecithin), 항생제, 글루타민(Glutamine), 아미노산(Amino acid) 및 비타민(Vitamins) 중에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0024] 본 발명의 바람직한 일실시예로서, 본 발명의 배양용 배양용 세포 배양 배지는 기타 첨가제로서, 지방산을 더 포함할 수도 있다.

[0025] 본 발명의 바람직한 일실시예로서, 본 발명의 배양용 배양용 세포 배양 배지의 배지 첨가제는, 세포 배양 배지 1L당 클로렐라 추출물을 0.001 ~ 0.500 g/L로 포함할 수 있다.

[0026] 본 발명의 바람직한 일실시예로서, 본 발명의 배양용 배양용 세포 배양 배지는, 세포 배양 배지 1L당 포스포디에스테라아제 억제제 11.2 ~ 112.0 g/L, 인슐린 0.01 ~ 1.00 g/L, 합성 글루코코티코이드 4.0 ~ 40.0 g/L, 티아졸리디네디온 3.6 ~ 36.0 g/L, 레시틴 0.012 ~ 0.120 g/L, 항생제, 글루타민 1.5 ~ 15.0 g/L, 아미노산 0.1 ~ 2.0 g/L 및 비타민 0.05 ~ 5.00 g/L 중에서 선택된 1종 이상을 더 포함할 수 있다.

[0027] 본 발명의 바람직한 일실시예로서, 본 발명의 배양용 배양용 세포 배양 배지는, 세포 배양 배지 1L당 지방산 5.7 ~ 57.0 g/L을 더 포함할 수도 있다.

[0028] 본 발명의 바람직한 일실시예로서, 본 발명의 배양용 배양용 세포 배양 배지의 배양 대상은 근육 줄기세포일 수 있다.

[0029] 본 발명의 바람직한 일실시예로서, 상기 근육 줄기세포는 동물 근육 줄기세포일 수 있다.

[0031] 본 발명의 다른 목적은, 앞서 설명한 세포 배양 배지를 이용한 배양용 배양 방법으로서, 동물 근육 줄기 세포를 지방세포로 교차분화시키는 세포 배양 공정을 수행한다.

[0032] 본 발명의 바람직한 일실시예로서, 상기 배양용 배양은, 37 ~ 41℃ 및 5.0 ~ 10.0% CO₂ 분위기의 배양기 내에서 배양을 수행할 수 있다.

[0033] 본 발명의 바람직한 일실시예로서, 본 발명의 배양용 배양 방법은 교차분화 효율 증대율은 하기 방정식 1을 만족할 수 있다.

[0034] [방정식 1]

[0035] $2.0\% \leq (B-A)/B \times 100\% \leq 15.0\%$

[0036] 방정식 1에서, A와 B는 세포배양배지에서 근육줄기세포를 배양시, 근육줄기세포의 지방세포로의 교차분화율을 의미하며, A는 클로렐라 추출물 미함유 세포배양배지를 이용하여 배양한 지방세포로의 교차분화율이고, B는 클로렐라 추출물 함유 세포 배양 배지를 이용하여 배양한 지방세포로의 교차분화율이다.

발명의 효과

[0038] 본 발명은 배양용 배양용 배지 첨가제, 이를 이용한 배양용 배양용 세포배양배지로서, 미세조류 일종인 클로렐라의 추출물을 배지 첨가제 성분으로 사용함으로써, 근육 줄기세포로부터 지방 세포로의 교차 분화를 효과적으

로 유도할 수 있으며, 근내 지방이 동시에 존재하는 세포를 유도하여 풍미가 개선된 배양육을 제공할 수 있다. 또한, 본 발명의 배지 첨가제를 사용함으로써, 배양육 배양 배지 성분인 소태아혈청을 대체하거나 소태아혈청과 혼용 사용함으로써, 값비싼 소태아혈청 사용을 줄이고, 배양육의 배양 효과를 증대시킴으로써, 가격 경제력이 우수한 배양육을 제공할 수 있다.

[0039] 본 발명의 효과는 이상에서 언급된 것들에 한정되지 않으며, 언급되지 않은 효과는 이하의 설명으로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0041] 도 1a 내지 도 1b는 클로렐라 추출물 처리에 따른 세포 생존율 평가에 대한 세포 실험 결과이다.

도 2는 실험에 2에서 실시한 세포 배양 배지 조성에 따른 닭 근육줄기세포를 지방세포로의 교차분화 효율 측정 결과이다.

도 3은 실험에 2에서 실시한 근육줄기세포가 교차분화된 DIC(Digital image correlation) 측정 이미지이다.

도 4는 실험에 3에서 실시한 세포 배양 배지 조성에 따른 C2C12 근원세포(myoblast)를 지방세포로의 교차분화 효율 측정 결과이다.

도 5는 실험에 3에서 실시한 C2C12 근원세포가 교차분화된 DIC(Digital image correlation) 측정 이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0042] 본 발명에 기재된 수치 한정 범위는 시작점과 종료점 범위 내의 모든 값들을 포함하며, 구체적인 예를 들면, “20℃ 내지 100℃”의 범위는 ‘20℃, 25℃, 30℃, 35℃, 40℃, 45℃, 50℃, 55℃, 60℃, 65℃, 70℃, 75℃, 80℃, 85℃, 90℃, 95℃, 100℃의 값들 뿐만 아니라 20℃ 내지 40℃, 50℃ 내지 70℃, 80℃ 내지 100℃’ 등과 같은 기재된 범위의 범주에 타당한 정수들 사이의 임의의 값도 포함 하는 의미이다. 또한, “10분 내지 100분”의 범위는 예를 들면, ‘10분 내지 20분, 20분 내지 30분, 30분 내지 40분, 40분 내지 50분, 60분 내지 70분, 70분 내지 80분, 80분 내지 90분, 90분 내지 100분까지를 포함하는 모든 정수들 뿐만 아니라 20분 내지 40분, 80분 내지 100분 이와 같이 기재된 범위의 범주에 타당한 정수들 사이의 임의의 값도 포함하는 의미이다.

[0043] 본 발명에서 용어 “배지”, “배양 배지”, “배양용 배지”, “배지 조성물”, “배양용 조성물”, “배양용 배지 조성물”은 체외 배양 조건에서 줄기세포의 성장 및 생존을 지지할 수 있게 하는 영양물질을 포함하는 배양액을 의미하는 것으로서 본 명세서에서는 구분되지 않고, 혼용하여 사용할 수 있다.

[0044] 본 발명에서 “근육 줄기세포”는 성장 정지 상태의 근위성세포(quiescent satellite cells)와 근아세포(myoblast)라 불리는 활성화된 근위성세포(activated satellite cells)와 같은 전구세포를 포함한다. 근육 줄기세포는 근세포로 분화할 수 있고, 특히, 가축 등의 동물 유래 근육 줄기세포는 실제 배양육 생산 등에 사용될 수 있어, 농생물학적으로 효용가치가 매우 높은 세포이다.

[0045] 본 발명에서 “근육 줄기세포의 배양”은 근육 줄기세포가 줄기세포능인 분화능을 유지한 채로, 세포증식하는 것을 의미한다.

[0047] 이하에서 본 발명을 더욱 자세하게 설명한다.

[0048] 본 발명의 배양육 배양용 배지 첨가제는 클로렐라 추출물을 포함한다.

[0049] 상기 클로렐라 추출물을 제조하는 방법은, 클로렐라 현탁액을 제조하는 1단계; 1단계의 클로렐라 현탁액을 초음파 처리하여 클로렐라 세포파쇄액을 제조하는 2단계; 상기 클로렐라 세포파쇄액을 환류추출 공정을 수행하여 열수 추출물을 수득하는 3단계; 상기 열수 추출물을 염기로 처리한 후, 원심분리공정을 수행하여 상등액을 취한 다음, 상등액을 중화 처리하여 클로렐라 추출액을 수득하는 4단계; 및 상기 클로렐라 추출액을 건조시켜서 분말화된 클로렐라 추출물을 수득하는 5단계;를 포함하는 공정을 수행한다.

[0050] 1단계의 상기 클로렐라 현탁액은 클로렐라 원말 및 물을 1 : 5 ~ 20 중량비로, 바람직하게는 1 : 8 ~ 15 중량비로, 더욱 바람직하게는 1 : 9 ~ 12 중량비로 혼합 및 교반하여 제조한 것을 사용할 수 있다.

- [0051] 1단계의 상기 클로렐라 원말을 구성하는 클로렐라는 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*), 클로렐라 피레노이도사(*Chlorella pyrenoidosa*), 클로렐라 레귤라리스(*Chlorella regularis*), 클로렐라 사코로필라(*Chlorella saccharophila*), 클로렐라 소로키니아나(*Chlorella sorokiniana*) 및 클로렐라 캡슐라타(*Chlorella capsulata*)로 중에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있고, 바람직하게는 클로렐라 불가리스, 클로렐라 피레노이도사 및 클로렐라 캡슐라타 중에서 선택된 1종 이상을, 더욱 바람직하게는 클로렐라 불가리스 및 클로렐라 캡슐라타 중에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0052] 다음으로, 2단계의 초음파 처리는 온도 0 ~ 20℃, 세기 10 ~ 50kHz 조건에서 수행할 수 있고, 바람직하게는 온도 0 ~ 10℃, 세기 15 ~ 30 kHz 조건에서 30분 ~ 2시간 동안 수행할 수 있다. 이때, 초음파 세기가 50kHz를 초과하면 강한 세기로 인하여 유효 성분이 분해되어 감소하는 문제가 있을 수 있고, 초음파 처리 온도가 40℃를 초과하면 고온에 의하여 유효 성분이 변성되어 함량이 감소하는 문제가 있을 수 있으므로, 상기 조건 하에서 초음파 처리를 수행하는 것이 유리하다.
- [0053] 다음으로, 3단계의 환류추출공정은, 2단계에서 초음파 처리한 클로렐라를 물 1: 1 ~ 100 중량비로, 바람직하게는 1: 5 ~ 50 중량비로 혼합하여 혼합액을 제조한 후, 상기 혼합액을 환류추출기를 이용하여 25 ~ 100℃ 하에서 10 분 ~ 3 시간 동안 환류추출을 수행할 수 있고, 바람직하게는 85 ~ 95℃ 하에서 10 분 ~ 1 시간 동안 환류추출을 수행하여, 열수 추출물을 수득할 수 있다.
- [0054] 다음으로, 4단계는 염기처리하는 공정으로서, 염기를 열수 추출물에 혼합하는 이유는 가용된 유효 성분을 세포벽으로부터 분리하기 위한 것이다.
- [0055] 상기 염기 처리는 상기 열수 추출물 및 물을 혼합한 후, 염기를 투입한 다음, 80 ~ 105℃ 조건에서 20분 ~ 50분간 열처리하여 수행할 수 있다.
- [0056] 이때, 상기 염기는 수산화나트륨 및 수산화칼륨 중에서 선택된 1종 이상을 사용할 수 있다. 이때, 염기의 농도는 0.100 ~ 2.000 N, 바람직하게는 0.100 ~ 1.000 N 인 것이 적절한데, 염기의 농도가 0.100 N 미만이면 가용된 유효 성분이 세포벽으로 분리가 잘 되지 않을 수 있고, 2.000 N를 초과하면 유효 성분이 파괴되는 문제가 있을 수 있다.
- [0057] 그리고, 염기 처리가 완료되면, 이를 원심분리한 뒤, 상등액을 취한 다음, 상등액을 중화공정을 수행한다.
- [0058] 그리고, 상기 중화공정은 상등액의 pH가 pH 7.0±0.3, 바람직하게는 7.0±0.1가 되도록 중화시켜서 수행하며, 중화처리는 염산 등의 산을 사용할 수 있다.
- [0059] 본 발명의 배양육 배양용 세포 배양 배지는 앞서 설명한 방법으로 제조한 클로렐라 추출물을 배지 첨가제로 사용함으로써, 세포 배양 배지 내 소태아혈청의 사용량을 줄이거나, 이를 대체함으로써, 배양육 제조단가를 낮출 수 있다.
- [0060] 본 발명의 배양육 배양용 세포 배양 배지는, 기초배지 및 상기 배지 첨가제를 포함하는 무혈청배지; 또는 기초배지, 소태아혈청(FBS) 및 상기 배지 첨가제를 포함하는 혈청배지를 포함할 수 있다.
- [0061] 그리고, 상기 배지 첨가제는 클로렐라 추출물을 포함하며, 클로렐라 추출물 외에 기타 첨가제를 더 포함할 수도 있다.
- [0062] 세포 배양 배지 성분 중 상기 기초배지는, 줄기세포의 배양에 적절한 해당 분야에서 사용되는 통상의 배지에서 임의로 선택될 수 있다. 또한, 배양 조건 역시 해당 분야에서 사용되는 적절한 조건에서 임의로 선택될 수 있다. 즉 배양하고자 하는 세포의 종류에 따라 배지와 배양 조건을 선택할 수 있다. 배양에 사용되는 배지는 세포 배양 최소 배지(cell culture minimum medium, CCMM)로서, 일반적으로 탄소원, 질소원, 및 미량원소 성분을 포함할 수 있다.
- [0063] 상기 기초배지의 바람직한 일례로서, 상기 기초배지는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), 젠그로(GenGro) 배지, DMEM/F-12 배지, 레이보비츠 L-15(Leibovitz's L-15) 배지, IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Medium), 맥코이즈 5A(McCoy's 5A) 배지, M199 배지, MEM(Minimum Essential Medium Eagle), α-MEM(Minimum Essential Medium Eagle, Alpha), 햄스 F-10 배지(Ham's F-10 Nutrient Mixture), 햄스 F-12 배지(Ham's F-12 Nutrient Mixture), RPMI1640 배지, BME(Basal Media Eagle), CMRL1066 배지, 피셔배지(Fischer's Medium), 웨이마우스 MB752/1 배지(Waymouth MB752/1 Medium), MCDB 배지 및 WME(Williams' Medium E) 중에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.

- [0064] 상기 무혈청 배지는 기초배지 외에, 인슐린(Insulin), 트랜스페린(Transferrin), 소디움세레나이트(Sodium selenite), FGF-2(Fibroblast growth factor), EGF(Epidermal Growth Factor), TGF β 3(Transforming growth factor), APS(1-ascorbate-2-phosphate trisodium salt), PDGF-BB(Platelet Derived Growth Factor) 및 HGF(Hepatocyte Growth Factor, recombinant) 중에서 선택된 1종 이상을 더 포함할 수 있다.
- [0065] 그리고, 상기 무혈청 배지 또는 혈청배지 내 기초배지의 사용량은, 세포 배양 배지 1L당 기초배지의 사용량은 500 ~ 1,000 g/L, 바람직하게는 530 ~ 972 g/L, 더욱 바람직하게는 600 ~ 900 g/L 정도로 사용하는 것이 적절하며, 무혈청 배지 사용량이 500 g/L 미만이면 효과가 미비하는 문제가 있을 수 있고, 60 g/L을 초과 사용하면 세포가 사멸하는 문제가 있을 수 있다.
- [0066] 그리고, 상기 혈청 배지 내 소태아혈청의 사용량은, 세포 배양 배지 1L당 1 ~ 200 g/L 로, 바람직하게는 50 ~ 150 g/L 으로 사용하는 것이 적절하다.
- [0067] 그리고, 상기 무혈청 배지 또는 혈청배지의 배지 첨가제는, 클로렐라 추출물을 세포 배양 배지 1L당 0.001 ~ 0.500 g/L 로, 바람직하게는 0.005 ~ 0.200 g/L로, 더욱 바람직하게는 0.010 ~ 0.080 g/L로 포함할 수 있으며, 클로렐라 추출물 농도가 0.001 g/L 미만이면 이의 사용으로 인한 교차분화 증대 효과가 미비하고, 0.500 mg/L을 초과 사용하더라도 이의 사용으로 인한 교차분화 증대 효과가 미비하거나 더 이상의 증대 효과가 없고, 세포독성 문제가 있을 수 있다.
- [0068] 또한, 상기 배지 첨가제는 클로렐라 추출물 외에, 기타 첨가제로서 포스포디에스테라아제 억제제(phosphodiesterase inhibitor), 인슐린(insulin), 합성 글루코코티코이드(glucocorticoid) 티아졸리디네디온(thiazolidinedione), 레시틴(lecithin), 항생제, 글루타민(Glutamine), 아미노산(Amino acid) 및 비타민(Vitamins) 중에서 선택된 1종 이상을 더 포함할 수도 있다.
- [0069] 기타 첨가제 성분 중 상기 포스포디에스테라아제 억제제는 IBMX(3-Isobutyl-1-methylxanthine), 실테나필(sildenafil), 타다라필(tadalafil), 바테나필(vardenafil), 아바나필(avanafil), 로플루밀라스트(roflumilast), 아프레밀라스트(apremilast), 딜라스트(ibudilast), 실로스타졸(cilostazol), 밀리논(milrinone), 테오필린(theophylline), 아미노필린(aminophylline), 및 메틸잔틴(methylxanthine) 중에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0070] 기타 첨가제 성분 중 상기 합성 글루코코티코이드는 덱사메타손(dexamethasone), 프리드니손(Prednisone), 메틸 프리드니솔론(Methylprednisolone), 하이드로코르티손(Hydrocortisone) 및 코르티솔(Cortisol) 중에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0071] 기타 첨가제 성분 중 상기 티아졸리디네디온은 로시글리타존(rosiglitazone), 피오글리타존(pioglitazone) 로베글리타존(lobeglitazone), 트로글리타존(troglitazone), 시글리타존(ciglitazone), 다르글리타존(darglitazone), 엔글리타존(englitazone), 네토글리타존(netoglitazone) 및 리보글리타존(rivoglitazone) 중에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0072] 기타 첨가제 성분 중 상기 항생제는 레시틴(lecithin)이 포함되어 있는 대두 레시틴(Soy lecithin), 해바라기 레시틴(Sunflower lecithin), 코코넛 레시틴(Coconut lecithin), 난유 레시틴(Egg yolk lecithin), 퀴노아 레시틴(Quinoa lecithin) 및 쌀겨 레시틴(Rice bran lecithin) 중에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0073] 또한, 상기 기타 첨가제는 지방산(fatty acid)을 더 포함할 수도 있으며, 상기 지방산은 올레산(Oleic acid)이 포함되어 있는 카놀라유(Canola oil), 올리브유(Olive oil), 아보카도유(Avocado oil), 피넛유(Peanut oil) 및 고올레산 해바라씨유(High-oleic sunflower oil) 중에서 선택된 1종 이상을 더 포함할 수 있다.
- [0075] 본 발명의 배양육 배양용 세포 배양 배지의 배지 첨가제로서, 클로렐라 추출물 및 기타 첨가제를 사용하는 바람직한 일구현예를 들면, 상기 기타 첨가제는 포스포디에스테라아제 억제제, 인슐린, 합성 글루코코티코이드, 지방산, 티아졸리디네디온, 레시틴, 항생제, 글루타민, 아미노산 및 비타민을 포함하는 경우, 세포 배양 배지 내 이들 성분의 적정 함량은 아래와 같다.
- [0076] 또한, 기타 첨가제로서, 포스포디에스테라아제 억제제(phosphodiesterase inhibitor)를 사용하고, 포스포디에스테라아제 억제제로서 IBMX를 사용하는 경우, IBMX는 세포 배양 배지 1L당 11.2 ~ 112.0 g/L로, 바람직하게는 15.0 ~ 60.0 g/L로 사용하는 것이 교차분화 측면에서 유리하다.

- [0077] 또한, 기타 첨가제로서, 인슐린을 사용하는 경우, 세포 배양 배지 1L당 0.01 ~ 1.00 g/L 로, 바람직하게는 0.20 ~ 0.90 g/L 로 사용하는 것이 교차분화 측면에서 유리하다.
- [0078] 또한, 기타 첨가제로서, 합성 글루코코티코이드를 사용하고, 합성 글루코코티코이드로서 텍사메타손을 사용하는 경우, 텍사메타손은 세포 배양 배지 1L당 4 ~ 40 g/L 로, 바람직하게는 5.0 ~ 30.0 g/L로 사용하는 것이 교차분화 측면에서 유리하다.
- [0079] 또한, 기타 첨가제로서, 티아졸리디네디온을 사용하고, 티아졸리디네디온으로서, 로시글리카존을 사용하는 경우, 로시글리카존을 세포 배양 배지 1L당 3.6 ~ 36 g/L 로, 바람직하게는 6.0 ~ 30.0 g/L 로 사용하는 것이 교차분화 하는 측면에서 유리하다.
- [0080] 또한, 기타 첨가제로서, 레시틴을 사용하는 경우, 세포 배양 배지 1L당 0.012 ~ 0.120 g/L 로, 바람직하게는 0.030 ~ 0.100 g/L 로 사용하는 것이 교차분화 측면에서 유리하다.
- [0081] 또한, 기타 첨가제로서, 항생제를 사용하는 경우, 세포 배양 배지 1L당 0.1 ~ 5.0 부피%로, 바람직하게는 0.3 ~ 1.2 부피%로 사용하는 것이 세포를 안정적으로 배양하는 측면에서 유리하다. 그리고, 상기 항생제로는 페니실린(penicillin), 스트렙토마이신(streptomycin) 및/또는 겐타마이신(gentamicin)을 사용할 수 있다.
- [0082] 또한, 기타 첨가제로서, 글루타민을 사용하는 경우, 세포 배양 배지 1L당 1.5 ~ 15.0 g/L로, 바람직하게는 2.5 ~ 12.0 g/L로 사용하는 것이 교차분화 측면에서 유리하다.
- [0083] 또한, 기타 첨가제로서, 아미노산을 사용하는 경우, 세포 배양 배지 1L당 0.1 ~ 2.0 g/L로, 바람직하게는 0.3 ~ 1.6 g/L로 사용하는 것이 교차분화 측면에서 유리하다.
- [0084] 또한, 기타 첨가제로서, 비타민을 사용하는 경우, 세포 배양 배지 1L당 0.05 ~ 5.00 g/L로, 바람직하게는 0.20 ~ 3.50 g/L로 사용하는 것이 교차분화 측면에서 유리하다.
- [0085] 또한, 기타 첨가제로서, 지방산을 더 사용하고, 지방산으로서 올레산(Oleic acid)이 포함되어 있는 카놀라유를 사용하는 경우, 세포 배양 배지 1L당 5.7 ~ 57 g/L로, 바람직하게는 6.5 ~ 45.0 g/L로 사용하는 것이 교차분화 하는 측면에서 유리하다.
- [0087] 본 발명의 상기 배양육 배양용 세포 배양 배지의 배양 대상 세포는 근육줄기세포, 중간엽줄기세포, 지방줄기세포, 섬유아세포, 배아줄기세포, 유도만능줄기세포, 혈관줄기세포 및/또는 동물성 세포 등이 있으며, 바람직하게는 돼지 유래, 소 유래 또는 닭 유래의 근육줄기세포, 중간엽줄기세포, 지방줄기세포, 섬유아세포, 배아줄기세포, 유도만능줄기세포, 혈관줄기세포일 수 있고, 더욱 바람직하게는 닭 유래의 근육줄기세포일 수 있다.
- [0088] 본 발명의 상기 배양육 배양용 세포 배양 배지를 이용한 배양육 배양 방법의 바람직한 일구현예를 들면, 근육줄기 세포를 지방세포로 교차분화시키는 세포 배양 공정을 수행할 수 있다.
- [0089] 좀 더 구체적으로 설명하면, 상기 세포 배양 공정은 앞서 설명한 배양육 배양용 세포 배양 배지를 배양에 사용한다. 그리고, 배양육 배양조건은 37 ~ 41℃ 및 5.0 ~ 10.0% CO₂ 분위기의 배양기 내에서, 바람직하게는 38 ~ 40℃ 및 5.0 ~ 7.0% CO₂ 분위기의 배양기 내에서 배양을 수행하는 것이 교차분화 측면에서 유리하다.
- [0090] 본 발명의 배지 첨가제를 포함하는 세포 배양 배지를 이용한 배양육 배양 방법은 근육 세포 또는 근육 줄기 세포를 지방세포로 교차분화 효율이 매우 우수하다. 이러한, 본 발명의 배양육 배양 방법은 교차분화 효율 증대율을 하기 방정식 1을 만족할 수 있다.
- [0091] [방정식 1]
- [0092] $2.0\% \leq (B-A)/B \times 100\% \leq 15.0\%$, 바람직하게는 $2.5\% \leq (B-A)/B \times 100\% \leq 12.5\%$, 더욱 바람직하게는 $4.5\% \leq (B-A)/B \times 100\% \leq 12.0\%$,
- [0093] 방정식 1에서, A와 B는 세포 배양 배지에서 근육줄기세포를 배양시, 근육줄기세포의 지방세포로의 교차분화율을 의미하며, A는 클로렐라 추출물 미함유 세포배양배지를 이용하여 배양한 근육줄기세포의 지방세포로의 교차분화율이고, B는 클로렐라 추출물 함유 세포 배양 배지를 이용하여 배양한 근육줄기세포의 지방세포로의 교차분화율이다.

- [0095] 앞서 설명한 배양육 배양용 세포 배양 배지를 이용하여 높은 경제성으로 고품질의 배양육을 제공할 수 있다.
- [0096] 본 발명에 있어서, 상기 배양육은 근육세포와 근내 지방이 동시에 존재할 수 있다.
- [0097] 나아가, 본 발명은 전술한 배양육을 포함하는 식품 조성물을 제공할 수 있다.

[0099] 본 발명의 바람직한 실시예를 통해 상세히 설명하며, 하기 실시예는 본 발명에 대해 예시하는 것이며, 본 출원이 하기 실시예에 의해 한정된 것은 아니다.

[0100] **[실시예]**

[0101] **실시예 1 : 클로렐라 추출물(배양 배지첨가제)의 제조**

[0102] 클로렐라로서, 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*, 대상 클로렐라 원말)를 준비하였다.

[0103] 다음으로, 상기 클로렐라 원말과 증류수를 1 : 10 중량비로 혼합하여 현탁액을 제조한 후, 이를 초음파 처리기에 투입한 다음, 출력량 700kW, 온도 4℃, 초음파 세기 20 kHz 조건에서 1시간 동안 초음파 처리를 수행하여 세포벽이 파쇄된 클로렐라 세포파쇄액을 수득하였다.

[0104] 다음으로, 상기 클로렐라 세포파쇄액을 환류추출기를 이용하여 95℃ 하에서 30분 동안 환류추출을 수행하여 열수 추출물을 수득하였다.

[0105] 다음으로, 상기 열수 추출물과 상기 현탁액 제조시 사용한 동량의 증류수를 혼합하여 혼합액을 제조한 다음, 0.25N 농도의 수산화나트륨을 농도가 0.125 N이 되도록 염기를 혼합액에 투입한 다음, 이를 오토클레이브(autoclave)에 넣은 후, 100℃에서 30분간 열처리하여 염기 처리를 수행하였다.

[0106] 다음으로, 염기 처리한 혼합액을 냉각시킨 다음, 3900rpm에서 20분간 원심분리한 뒤 상등액을 취하였다.

[0107] 다음으로, 상기 상등액에 염산을 이용하여 pH 7.0±0.1 로 중화시켜서 클로렐라 추출액을 수득하였다.

[0108] 다음으로, 상기 클로렐라 추출액을 동결건조시켜서 분말화된 클로렐라 추출물을 수득하였다.

[0110] **제조예 1 : 배양육 배양용 세포 배양 배지의 제조**

[0111] 실시예 1에서 제조한 클로렐라 추출물은 배양 배지의 첨가제로 사용하여, 하기와 같은 조성의 배양육 교차분화용 세포 배양 배지를 제조하였다.

[0112] 상기 배양육 교차분화용 세포 배양 배지는, 기초배지로서, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium High glucose) 900 g/L 및 인슐린 0.01 g/L, FBS 100 g/L, 배지 첨가제로서 실시예 1의 클로렐라 추출물, 배지 첨가제의 기타 첨가제로서 포스포디에스테라아제 억제제인 IBMX(3-Isobutyl-1-methylxanthine) 11.2 g/L, 인슐린 0.1 g/L, 합성 글루코코티코이드인 텍사메타손 4.0 g/L, 티아졸리디네디온인 로시글리카존 3.6 g/L를 포함한다.

[0113] 이때, 배지 첨가제(실시예 1의 클로렐라 추출물)은 0.001 g/L, 0.01 g/L, 0.03 g/L, 0.05 g/L, 0.07 g/L 및 0.1 g/L로 각각 투입하여 별도의 배양 배지를 제조하였다.

[0115] **비교제조예 1**

[0116] 상기 제조예 1과 동일한 조성의 세포 배양 배지를 제조하되, 배지 첨가제로서, 실시예 1의 클로렐라 추출물 대신 D사의 클로렐라 분말(총 엽록소 1 중량% 함유)을 0.001 g/L, 0.01 g/L, 0.03 g/L, 0.05 g/L, 0.07 g/L 및 0.1 g/L 으로 사용하였다.

[0118] **비교제조예 2**

[0119] 상기 제조예 1과 동일한 조성의 세포 배양 배지를 제조하되, 배지 첨가제로서, 실시예 1의 클로렐라 추출물 대신 시중 판매되는 클로렐라 분말(Shaanxi Ruiwo Phytochem Growth Factor Chlorella Extract CGF OD1200)을 0.001 g/L, 0.01 g/L, 0.03 g/L, 0.05 g/L, 0.07 g/L 및 0.1 g/L 으로 사용하였다.

[0121] **비교제조예 3(양성대조군)**

[0122] 상기 제조예 1과 동일한 조성의 세포 배양 배지를 제조하되, 배지 첨가제(실시에 1의 클로렐라 추출물)를 사용하지 않은 세포 배양 배지를 대조군(Control)로 제조하였다.

표 1

[0123]

구분 (g/L)		음성 대조군	비교제조예 3 (양성대조군)	제조예 1, 비교제조예 1~2
기초 배지	DMEM	900	875.48	875.38
	인슐린	0	0.01	0.01
소태아혈청 (FBS)		100	100	100
배지 첨가제	클로렐라 추출물	0	0	0.001 ~ 0.100
	IBMX	0	11.2	11.2
	텍사메타손	0	4.0	4.0
	로시글리카존	0	3.6	3.6
	레시틴	0	0.012	0.012

[0125] **실험예 1 : 세포 배양 배지의 세포 독성 실험**

[0126] 제조예 1, 비교제조예 1 ~ 2에 제조한 클로렐라 추출물 농도별 세포 배양 배지에 대한 닭 근육줄기세포에 대한 세포 독성(또는 세포 생존율)을 CCK8 assay를 실시하여 측정하였고, 그 결과를 도 1a(제조예 1), 도 1b(비교제조예 1) 및 도 1c(비교제조예 2)에 나타내었다.

[0127] 도 1a ~ 도 1c를 살펴보면, 제조예 1뿐만 아니라, 비교제조예 1 ~ 2 모두 세포배양 배지 내 클로렐라 추출물 농도가 30 mg/L(0.03 g/L) 이상에서 세포 독성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 그리고, 100 mg/L(0.1 g/L) 이상의 농도에서는 농도 의존적으로 세포 생존율이 감소하는 것을 확인하였다. 따라서, 교차분화율 측정 실험은 세포에 독성을 미치지 않는 수준인 10 mg/L(0.01 g/L)의 농도에서 진행하였다.

[0129] **실험예 2 : 닭 근육줄기세포의 지방세포로의 교차분화율 측정 실험**

[0130] 제조예 1 및 비교제조예 1 ~ 2에서 제조한 클로렐라 추출물을 10 mg/L(0.01 g/L)로 포함하는 배양육 배양용 세포 배양 배지 및 비교제조예 1 ~ 2의 세포 배양 배지 각각으로 닭 근육줄기세포를 배양하여 지방세포로의 교차분화율 측정 실험을 수행하였다.

[0131] 상기 닭 근육줄기세포는 무균실험실에서 배양된 유정란을 이용하여 17일, 18일, 19일 부화한 닭의 가슴과 다리에서 추출한 세포로부터 수득한 것을 사용하였다.

[0132] 실험방법은, 닭 근육줄기세포에서 교차분화 배양한 지방세포에 배지를 제거한 후 세포를 세척하기 위해 DPBS를 첨가하고 골고루 섞이게 한 뒤 제거했다.

[0133] 다음으로, 4% 포르말린 용액을 실온에서 첨가하고, 최소 1시간 동안 방치했다. 다음으로, 포르말린을 제거한 후에 증류수로 3회 세척하고 60 부피% 농도의 이소프로판올(iso-propanol)을 첨가한 후, 5분 동안 방치한 뒤, iso-propanol을 제거하고 완전히 말린다. Oil Red O 작동 용액(Working Solution)을 첨가하고 10분 동안 실온에서 방치한다. Oil red O 용액을 제거하고 즉시 3차 증류수를 첨가한다. 현미경으로 관찰한 후 세포가 염색된 것을 확인 후 촬영하였다. 물을 버린 뒤 플라스크를 말린다. 100 부피% 농도의 이소프로판올(iso-propanol)을 첨가하여 10분 동안 천천히 흔들어서 Oil Red O가 완전히 녹아 나오도록 한다. 마이크로플레이트 리더를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였고, 630 nm에서 또 흡광도를 측정하여 490 nm의 흡광도를 보정하였다.

[0134] 그리고, 결과를 하기 표 3 및 도 2에 나타내었으며, 도 3에 양성대조군 및 제조예 1의 근육줄기세포가 교차분화된 DIC(Digital image correlation) 측정 이미지를 나타내었다.

[0135] 또한, 표 2의 교차분화 증대율은 양성대조군의 교차분화율 대비 교차분화율 증대율을 나타낸 것이다.

[0136] 표 2의 음성대조군 및 양성대조군은 상기 표 2의 조성을 가지는 배지로 실험을 수행한 것이다.

표 2

[0137]

구분	음성 대조군	양성 대조군	제조예 1	비교 제조예1	비교 제조예2
근육줄기세포의 지방세포로의 교차분화율	-	24%	29%	26%	24%
교차분화증대율	-	-	5%	1%	0%

[0138] 상기 표 2 및 도 2를 살펴보면, 제조예 1의 세포 배양 배지가 가장 높은 교차분화율을 가짐을 확인할 수 있으며, 비교제조예 2는 클로렐라 추출물을 포함함에도 불구하고, 교차분화 증대 효과가 없었다.

[0139] 또한, 제조예 1이 비교제조예 1의 세포 배양 배지 보다 5배의 교차분화 증대율 상승 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

[0141] 실험예 3 : C2C12 근원세포(myoblast)에 대한 교차분화율 측정 실험

[0142] 제조예 1 에서 제조한 클로렐라 추출물을 10 mg/L(0.01 g/L)로 포함하는 배양육 배양용 세포 배양 배지로 C2C12 근원세포(myoblast)를 배양하여 지방세포로의 교차분화율 측정 실험을 수행하였고, 실험방법 및 조건은 실험예 2와 동일하게 수행하였고, 그 결과를 하기 표 3 및 도 4에 나타내었으며, 도 5에 양성대조군 및 제조예 1의 C2C12 근원세포가 교차분화된 DIC 측정 이미지를 나타내었다.

[0143] 그리고, 하기 표 3의 양성대조군은 상기 표 2의 조성을 가지는 배지로 실험을 수행한 것이다.

표 3

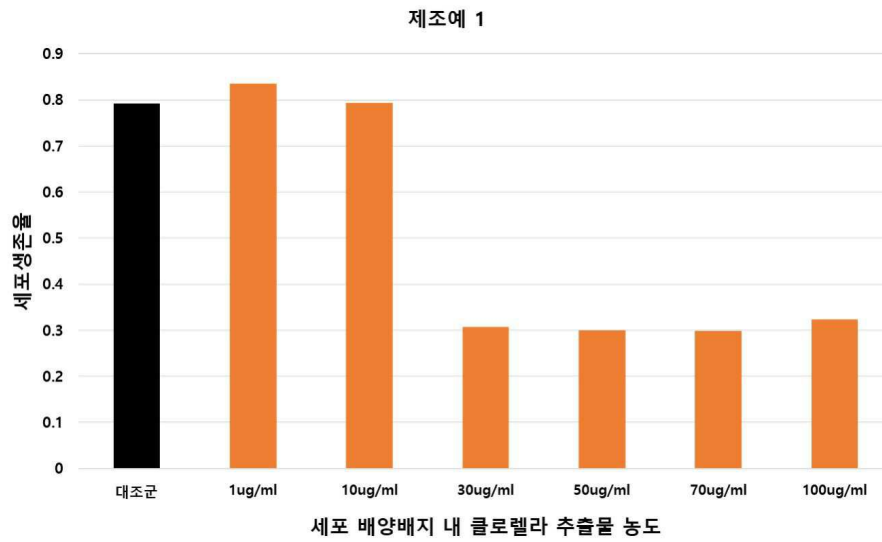
[0144]

구분	비교제조예3 (양성대조군)	제조예 1
지방세포로의 교차분화율	28%	57%
교차분화증대율	-	29%

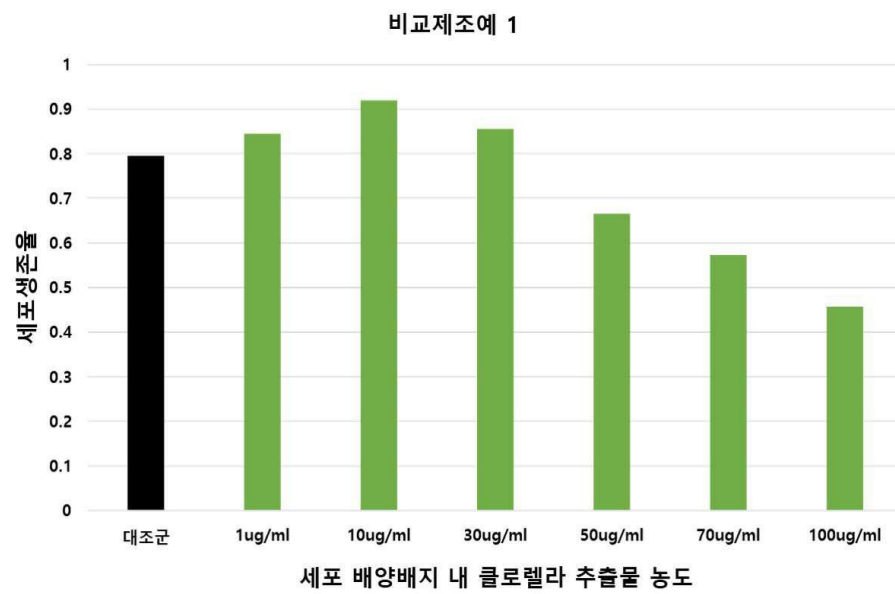
[0145] 상기 실시예 및 실험예를 통하여, 본 발명에서 제시한 방법으로 제조한 클로렐라 추출물이 배양육 배양용 배지의 첨가제로서, 세포 증식, 배양 효과가 우수하며, 이를 배양육 배양용 배지로 사용함으로써, 근육 세포 또는 근육 줄기 세포를 지방세포로 교차분화율이 매우 우수함을 확인할 수 있었다.

도면

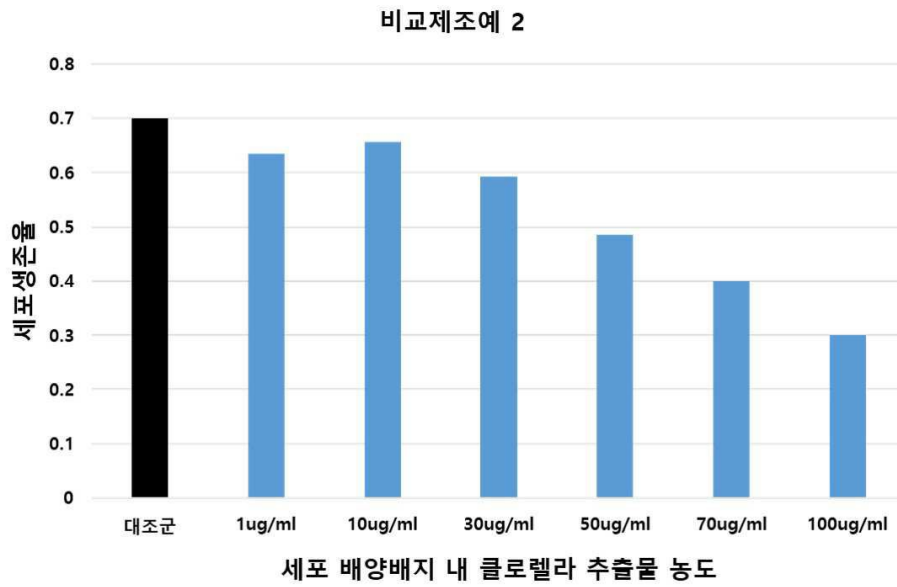
도면1a



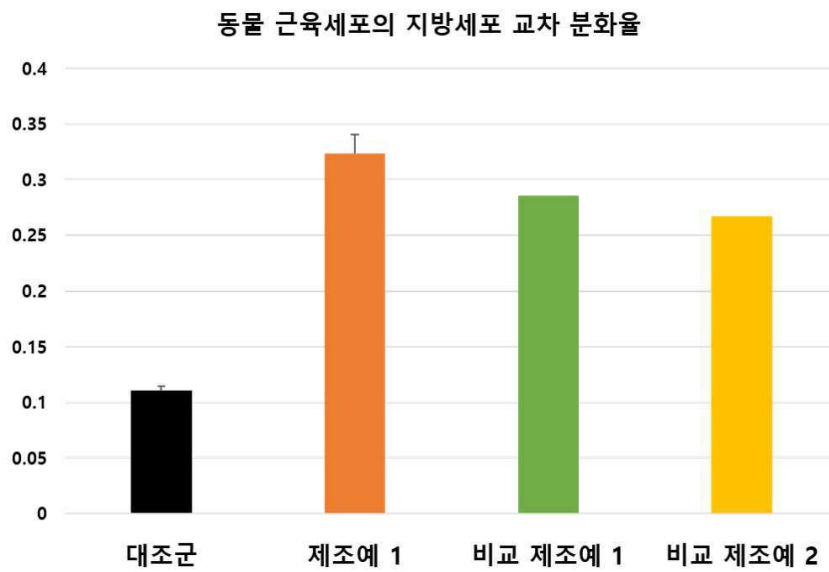
도면1b



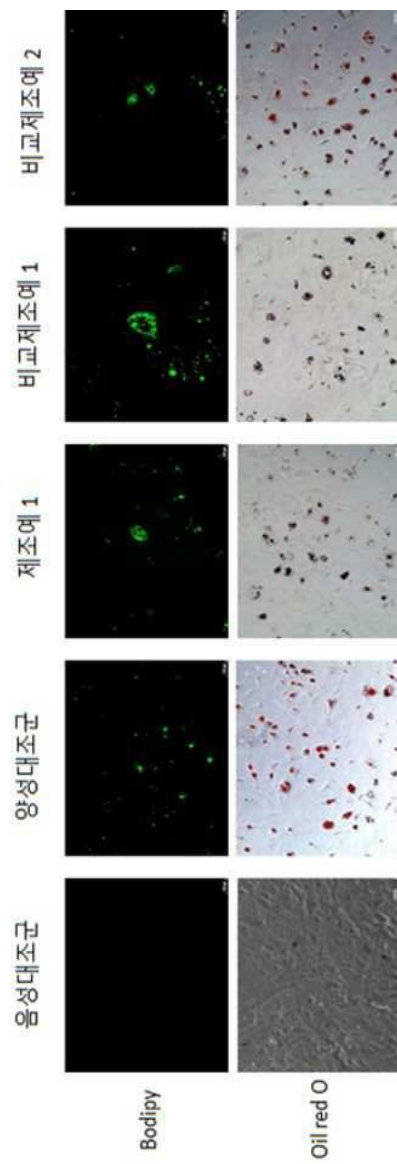
도면1c



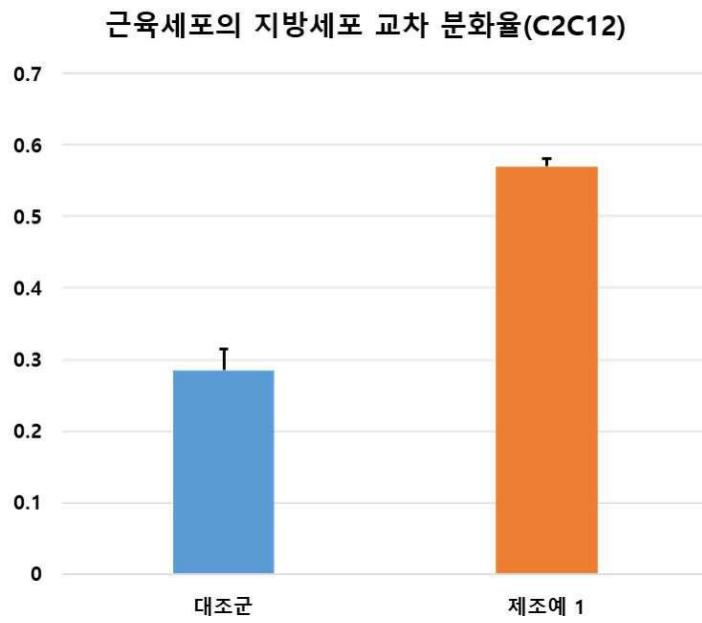
도면2



도면3



도면4



도면5

