(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0077644
(43) 공개일자 2023년06월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/00 (2006.01) *A23L 13/00* (2016.01)
C12N 5/077 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0018 (2013.01)
A23L 13/00 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2022-0141590
(22) 출원일자 2022년10월28일
심사청구일자 2022년10월28일
(30) 우선권주장
1020210164624 2021년11월25일 대한민국(KR)

(71) 출원인
중앙대학교 산학협력단
서울특별시 동작구 흑석로 84 (흑석동)
(72) 발명자
허선진
경기도 화성시 동탄신리천로1길 74, 1904동 103호(목동, 호반베르디움 센트럴포레)
이다영
경기도 군포시 고산로151번길 26-23, 105동 1902호(당정동, 당정마을 엘지아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이명진

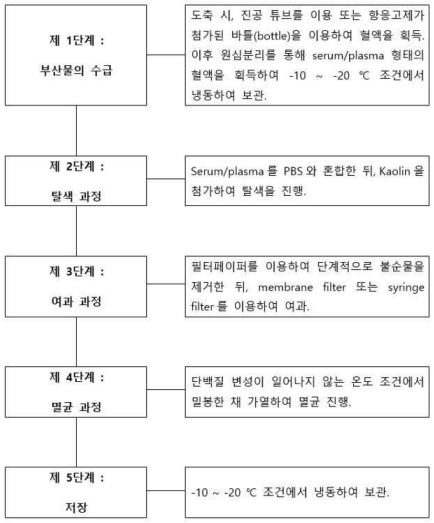
전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 발명의 명칭 **도축 부산물에서 유래한 FBS(fetal bovine serum) 대체제 활용 배양육의 생산 방법**

(57) 요 약

본 발명은 도축 부산물에서 유래한 FBS(fetal bovine serum) 대체제 활용 배양육의 생산 방법 관한 것으로, 더욱 상세하게는 도축 부산물로부터 배양육 배양용 배지 첨가제(FBS 대체체)를 제조하는 방법, 상기 방법으로 제조된 배양육 배양용 배지 첨가제, 상기 첨가제를 포함하는 배양육 배양용 배지 조성물 및 이를 이용한 배양육의 제조 방법에 관한 것이다. 본원 발명 특유의 방법으로 제조된 배양육 배양용 배지 첨가제(FBS 대체제)를 이용하면, 종래 단가가 높고, 살아있는 송아지에서 채취해야 하는 윤리적 문제를 갖고 있는 소태아혈청(FBS)을 완전히 대체하거나 병용하여 소태아혈청(FBS) 사용량을 줄일 수 있으면서, 배양육의 생산 효율을 향상시킬 수 있다. 또한 식육 생산을 위한 가축의 도축 시 필수적으로 발생하는 도축 부산물의 활용성을 높여 그 가치를 높이고, 폐기 비용 절감 및 소득 증대 등의 경제적 효과가 커지는 이점이 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12N 5/0658 (2013.01)
C12N 2500/80 (2013.01)
C12N 2500/90 (2013.01)
(72) 발명자
이승연
강원도 원주시 백간길 72, 102동 1202호(단계동, 라이프타운)
정재원
경기도 의왕시 어내들로 5, 102동 1801호(오전동, 의왕 더샵 캐슬)
김재현
부산광역시 강서구 명지오션시티10로 16, 211동 1503호(명지동, 영어도시 퀸덤1차)
김현우
서울특별시 구로구 구로중앙로30길 11-1, 3층(구로동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1545025183
과제번호 321028052SB010
부처명 농림축산식품부
과제관리(전문)기관명 농림식품기술기획평가원
연구사업명 고부가가치식품기술개발
연구과제명 배양육의 최적 근육조직화 기술 및 대량생산 시스템 개발
기 여 율 1/2
과제수행기관명 경상국립대학교 산학협력단
연구기간 2022.01.01 ~ 2022.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1545026157
과제번호 322008051SB010
부처명 농림축산식품부
과제관리(전문)기관명 농림식품기술기획평가원
연구사업명 고부가가치식품기술개발
연구과제명 주요 축종별 근육줄기세포 특성 분석 및 식품안정성이 보장된 최적의 기본배지 개발을 통한 대량 배양시스템을 확립
기 여 율 1/2
과제수행기관명 영남대학교 산학협력단
연구기간 2022.04.01 ~ 2022.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

(i) 도축 시 부산물로서 인간을 제외한 동물로부터 분리된 혈액으로부터 혈청 또는 혈장을 수득하는 단계;

(ii) 상기 (i) 단계에서 수득한 혈청 또는 혈장을 탈색 하는 단계; 및

(iii) 상기 (ii) 단계에서 수득한 탈색된 혈청 또는 혈장을 여과하는 단계;

를 포함하는, 도축 부산물로부터 배양육 배양용 배지 첨가제를 제조하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 동물은

소, 돼지 및 닭으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 소는 30 내지 48개월령(month age)이고,

상기 닭은 2 내지 8주령(week age)이며,

상기 돼지는 180 일령(day age)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 탈색은,

상기 (i) 단계에서 수득한 혈청 또는 혈장에 고령토(kaolin)를 혼합하는 것에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 탈색은

50 내지 70 ℃ 온도에서 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 여과는,

직경 0.05 내지 0.3 ㎛ 크기 공극으로 여과하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 여과는,

직경 2㎛ 내지 25㎛ 크기 공극으로 사전 여과하는 과정을 추가로 포함하는 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 여과는,

멤브레인 필터(Membrane Filter) 여과인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 여과는,

필터 페이퍼(filter paper), 시린지 필터(Syringe Filter) 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 방법의 여과를 추가적으로 수행하는 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 방법은,

상기 (iii) 단계에서 여과 과정 이후에 멸균 과정을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 멸균은,

50 내지 70 ℃ 온도에서 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제1항의 방법으로 제조된, 배양육 배양용 배지 첨가제.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 배양육 배양용 배지 첨가제는,

근육 위성세포(satellite cell) 증식용 배지 첨가제인 것을 특징으로 하는 배양육 배양용 배지 첨가제.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 배양육 배양용 배지 첨가제는

소태아혈청(FBS)을 대체하거나 또는 소태아혈청(FBS)과 병행하여 사용되는 것을 특징으로 하는 배양육 배양용 배지 첨가제.

청구항 15

제12항의 배양육 배양용 배지 첨가제를 포함하는 배양육 배양용 배지 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 배양육 배양용 배지 조성물은,

근육 위성세포(satellite cell) 증식용인 것을 특징으로 하는 배양육 배양용 배지 조성물.

청구항 17

제15항에 있어서, 상기 배양육 배양용 배지 조성물은,

무혈청 배지 100 중량부에 대하여,

제12항의 배양육 배양용 배지 첨가제를 1 내지 20 중량부; 및

항생제/항균제 0.5 내지 1.5 중량부

를 포함하는 것을 특징으로 하는 배양육 배양용 배지 조성물.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 무혈청 배지는,

Ham's 10 medium, Ham's 12 medium, DMEM, MEM, MCDB-201 medium 및 RPMI 1640 medium 중에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 배양육 배양용 배지 조성물.

청구항 19

제17항에 있어서, 상기 항생제/항균제는,

페니실린 및 스트렙토마이신 중에서 선택된 1종 이상의 항생제; 및

암포테리신-B, 클로트리마졸, 미코나졸, 케토코나졸 및 니스타틴 중에서 선택된 1종 이상의 항진균제

를 포함하는 것을 특징으로 하는 배양육 배양용 배지 조성물.

청구항 20

제15항에 있어서, 상기 배양육 배양용 배지 조성물은,

추가적으로 소태아혈청(FBS)을 포함하는 배양육 배양용 배지 조성물.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 배양육 배양용 배지 조성물은,

무혈청 배지 100 중량부에 대하여,

제12항의 배양육 배양용 배지 첨가제를 10 내지 20 중량부;

소태아혈청(FBS)을 0 내지 20 중량부; 및

항생제/항균제 0.5 내지 1.5 중량부

를 포함하는 것을 특징으로 하는 배양육 배양용 배지 조성물.

청구항 22

제15항 내지 제21항 중에서 선택된 어느 하나의 배양육 배양용 배지 조성물을 이용하여 근육 위성세포를 증식하는 단계;를 포함하는 배양육의 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 도축 부산물에서 유래한 FBS(fetal bovine serum) 대체제 활용 배양육의 생산 방법 관한 것으로, 더욱 상세하게는 도축 부산물로부터 배양육 배양용 배지 첨가제(FBS 대체체)를 제조하는 방법, 상기 방법으로 제조된 배양육 배양용 배지 첨가제, 상기 첨가제를 포함하는 배양육 배양용 배지 조성물 및 이를 이용한 배양육의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 국제연합식량농업기구(FAO)의 보고에 의하면 세계 인구는 2050년에는 95억명으로 증가할 것으로 전망하고 있다. 그러나 온난화와 같은 지구의 이상 기후로 인해 작물의 수확량은 감소될 것으로 예상되는 반면, 사료용 곡물의 수요는 늘어 생산비가 오르고 생산면적이 줄어들게 되어 식량자원으로서 축산물은 고가의 먹거리가 될 것으로 보고 있다.

[0004] 축산물과 같은 동물유래 식품은 투입 에너지와 생산 측면에서는 고가이긴 하나, 인간의 정상적인 성장과 건강에 필수적인 양질의 단백질과 미량영양소의 최상 공급원이기 때문에 인간의 영양확보에 직접적인 공헌을 해왔다. 특히, 필수아미노산은 체내에서 합성되지 않거나 합성이 되어도 양이 매우 적어 반드시 음식으로 섭취해야만 하는 영양분으로서, 2050년 동물유래 식품의 수요는 5.5억톤으로 현재의 2배에 도달할 것이라는 예측을 볼 때, 필수아미노산을 공급하기 위하여 필요한 단백질을 전통적인 축산물 생산방식으로 감당하기에는 한계가 있다.

[0005] 미래의 육류 부족 문제를 해결하기 위한 방안으로서, 최근에는 직접 가축을 사육하여 고기를 생산하는 방식을 대체하기 위한 '배양육(cultured meat)'이 주목을 받고 있다. 배양육이라 함은 살아있는 동물의 세포를 채취한 뒤 세포 공학 기술로 증식하여 얻게 되는 식용 고기를 의미하며, 가축을 사육하는 과정을 거치지 않고 고기를 얻는 세포농업(cellular agriculture)의 한 분야라고 할 수 있다. 한국어로는 배양육, 대체육 또는 인공고기라는 말로 불리며, 영어로는 시험관에서 키운다는 의미로 in vitro meat, 천연이 아닌 인간이 줄기세포를 이용하여 합성한다는 의미에서 artificial meat, 전통적인 사육시설이 아닌 청정한 생산시설에서 생산된다는 의미로 clean meat, 일부 시제품은 실험실에서 만들어지기도 해서 lab-grown meat로 불리고 있다.

[0006] 배양육에는 주로 줄기세포인 근육위성세포를 활용하며, 이외에도 배아줄기세포, 유도만능줄기세포, 지방유래 성체줄기세포 등의 세포는 분화능은 충분하지만 근육조직을 성공적으로 분화된 사례가 없다. 반면 근육위성세포는 골격근 상처 시 재생 역할을 수행하며 오직 근육 조직으로만 분화하기 때문에 배양육 생산에 가장 적합하다고 알려져 있다.

[0007] 이러한 배양육의 증식 및 분화 과정에 사용되는 세포 배지에서 가장 중요한 물질은 소 태아 혈청(Fetal bovine serum, FBS)이다. 소 태아 혈청(FBS)은, 부득이하게 임신한 소가 도축된 경우 복중 태아에서 채취한 혈액 분획물을 통해 획득할 수 있다. FBS는 일반적인 혈청(serum)과 비교했을 때 항체의 양이 적고, 성장인자를 많이 함유하고 있어 세포 배양에 효과적이며, 출산 이전의 태아에서 획득하기 때문에 최소한의 항체만을 함유하고 있어, 다양한 세포에서 면역 반응을 일으킬 가능성이 적다. 이외에도, 백신이나 의약품 개발과 같은 생명공학 연구에 사용되는 FBS는 점점 더 그 수요가 증가할 전망이지만, 이렇게 세포 배양에 필수적이라고 할 수 있는 FBS를 얻기 위해서는 임신한 소가 도축되고 그 태아를 활용해야 하며, 이에 따라 수급이 불안정하고 비용이 비싸다는 단점이 있다.

[0008] 이러한 FBS의 단점을 해결하고자, FBS를 사용하지 않는 무혈청(FBS free) 배지를 사용한 다양한 연구들이 진행되어 왔으나, 무혈청 배지의 경우 세포 분열이나 세포의 성장 속도가 현저히 느려지는 단점이 있다. 이외에도 국내 FBS 대체를 위한 기술로는, 대한민국 등록특허 10-1950245(특허문헌 1)와 같이 해양 생물을 기반으로하는 FBS 대체 serum-free 바이오소재 개발 등이 있으나, 이의 실제 대중적 이용가능성에 대해서는 미지수이다.

[0009] 따라서 기존 FBS로 인한 상기와 같은 문제들을 해결할 수 있으면서, 세포 배양에 효능이 있는 대체 물질의 개발

이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) 한국등록특허 10-1950245

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명은 위와 같은 종래 기술의 과제를 해결하기 위한 것으로서, 본 발명자들은 세포 배양용으로 활용할 수 있는 품질의 FBS 대체제를 폐기되는 소, 돼지 또는 닭 등의 동물로부터 도축 부산물을 활용하여 생산할 수 있는 방법을 연구하던 중, 본원 발명 특유의 방법으로 제조된 FBS 대체제(배양육 배양용 배지 첨가제)를 이용하면, 종래 단가가 높고, 살아있는 송아지에서 채취해야 하는 윤리적 문제를 갖고 있는 소태아혈청(FBS)을 완전히 대체하거나 병용하여 소태아혈청(FBS) 사용량을 줄일 수 있으면서도, 배양육의 생산 효율을 향상시킬 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0013] 이에, 본 발명의 목적은,

[0014] (i) 도축 시 부산물로서 인간을 제외한 동물로부터 분리된 혈액으로부터 혈청 또는 혈장을 수득하는 단계;

[0015] (ii) 상기 (i) 단계에서 수득한 혈청 또는 혈장을 탈색 하는 단계; 및

[0016] (iii) 상기 (ii) 단계에서 수득한 탈색된 혈청 또는 혈장을 여과하는 단계;

[0017] 를 포함하는, 도축 부산물로부터 배양육 배양용 배지 첨가제(FBS 대체제)를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[0018] 본 발명의 다른 목적은, 상기 본 발명의 제조 방법으로 제조된, 배양육 배양용 배지 첨가제(FBS 대체제)를 제공하는 것이다.

[0019] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 본 발명의 배지 첨가제(FBS 대체제)를 포함하는 배양육 배양용 배지 조성물을 제공하는 것이다.

[0020] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 본 발명의 배양육 배양용 배지 조성물을 이용하여 근육 위성세포를 증식하는 단계;를 포함하는 배양육의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0021] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0023] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

[0024] (i) 도축 시 부산물로서 인간을 제외한 동물로부터 분리된 혈액으로부터 혈청 또는 혈장을 수득하는 단계;

[0025] (ii) 상기 (i) 단계에서 수득한 혈청 또는 혈장을 탈색 하는 단계; 및

[0026] (iii) 상기 (ii) 단계에서 수득한 탈색된 혈청 또는 혈장을 여과하는 단계;

[0027] 를 포함하는, 도축 부산물로부터 배양육 배양용 배지 첨가제(FBS 대체제)를 제조하는 방법을 제공한다.

[0028] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 동물은 소, 닭 및 돼지로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0029] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 소는 30 내지 48개월령(month age)이고, 상기 닭은 2 내지 8주령(week

age)이며, 상기 돼지는 180 일령(day age)인 것을 특징으로 하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0030] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 (ii) 단계의 탈색은, 상기 (i) 단계에서 수득한 혈청 또는 혈장에 고령토(kaolin)를 혼합하는 것에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0031] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 (ii) 단계의 탈색은, 50 내지 70 ℃ 온도에서 수행되는 것을 특징으로 하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0032] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 (iii) 단계의 여과 과정은, 직경 0.05 내지 0.3 ㎛ 크기 공극으로 여과하는 것을 특징으로 하는 것일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0033] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 (iii) 단계의 여과 과정은, 직경 2㎛ 내지 25㎛ 크기 공극으로 사전 여과하는 과정을 추가로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0034] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 상기 (iii) 단계의 여과는 멤브레인 필터(Membrane Filter) 여과인 것을 특징으로 하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0035] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 여과는, 멤브레인 필터(Membrane Filter) 여과 외에, 필터 페이퍼(filter paper), 시린지 필터(Syringe Filter) 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 방법의 여과를 추가적으로 수행할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0036] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 본 발명의 도축 부산물로부터 배양육 배양용 배지 첨가제(FBS 대체제)를 제조하는 방법은, 상기 (iii) 단계에서 여과 과정 이후에 멸균 과정을 추가로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0037] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 멸균은 50 내지 70 ℃ 온도에서 수행되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0038] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은, 상기 본 발명의 제조 방법(도축 부산물로부터 배양육 배양용 배지 첨가제(FBS 대체제)를 제조하는 방법)으로 제조된, 배양육 배양용 배지 첨가제(FBS 대체제)를 제공한다.

[0039] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 본 발명의 배양육 배양용 배지 첨가제는, 근육 위성세포(satellite cell) 증식용 배지 첨가제인 것을 특징으로 하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0040] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 본 발명의 배양육 배양용 배지 첨가제는, 소태아혈청(FBS)을 대체하거나 또는 소태아혈청(FBS)과 병행(병용)하여 사용되는 것을 특징으로 하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0041] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은, 상기 본 발명의 배양육 배양용 배지 첨가제(FBS 대체제)를 포함하는 배양육 배양용 배지 조성물을 제공한다.

[0042] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 본 발명의 배양육 배양용 배지 조성물은, 근육 위성세포(satellite cell) 증식용인 것을 특징으로 하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0043] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 본 발명의 배양육 배양용 배지 조성물은, 무혈청 배지 100 중량부에 대하여, 상기 본 발명의 배양육 배양용 배지 첨가제(FBS 대체제)를 1 내지 20 중량부; 및 항생제/항균제 0.5 내지 1.5 중량부를 포함하는 것을 특징으로 하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0044] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 무혈청 배지는 Ham's 10 medium, Ham's 12 medium, DMEM, MEM, MCDB-201 medium 및 RPMI 1640 medium 중에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0045] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 항생제/항균제는, 페니실린 및 스트렙토마이신 중에서 선택된 1종 이상의 항생제; 및 암포테리신-B, 클로트리마졸, 미코나졸, 케토코나졸 및 니스태틴 중에서 선택된 1종 이상의 항진균제를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0046] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 본 발명의 배양육 배양용 배지 조성물은, 추가적으로 소태아혈청(FBS)을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이러한 일 구현예에서, 본 발명의 배양육 배양용 배지 조성물은, 무혈청 배지 100 중량부에 대하여, 본 발명의 배양육 배양용 배지 첨가제(FBS 대체체)를 10 내지 20 중량부; 소태아혈청(FBS)을 0 내지 20 중량부; 및 항생제/항균제 0.5 내지 1.5 중량부를 포함하는 것을 특징으로 하는 것일 수 있

으나, 이에 제한되지 않는다.

[0047] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은,

[0048] 상기 본 발명의 배양육 배양용 배지 조성물을 이용하여 근육 위성세포를 증식하는 단계;를 포함하는 배양육의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0050] 본원 발명 특유의 방법으로 제조된 배양육 배양용 배지 첨가제(FBS 대체제)를 이용하면, 종래 단가가 높고, 살아있는 송아지에서 채취해야 하는 윤리적 문제를 갖고 있는 소태아혈청(FBS)을 완전히 대체하거나 병용하여 소태아혈청(FBS) 사용량을 줄일 수 있으면서도, 배양육의 생산 효율을 향상시킬 수 있다. 또한 식육 생산을 위한 가축의 도축 시 필수적으로 발생하는 도축 부산물의 활용성을 높여 그 가치를 높이고, 폐기 비용 절감 및 소득 증대 등의 경제적 효과, 그리고 환경 보호 효과가 커지는 이점이 있다.

[0051] 구체적으로, 기존에 소태아혈청(FBS) 사용에 따른 문제들을 해결하기 위해, 본 발명자들은 기존 FBS를 대체하기 위한 방안으로, 식육 생산을 위한 가축 도축 시 발생하는 혈액의 활용을 본원 발명에서 제안하였다. 이렇게 가축 도축 시 부산물로서 얻을 수 있는 혈액을 이용해 본원 발명 특유의 방법으로 생산된 FBS 대체제(배지 첨가제)를 활용하면, 기존 FBS 제품의 수급 불안정과 높은 가격 문제를 해소할 수 있고, 폐기되는 도축 부산물의 활용을 통해 불필요한 폐기 처리 비용을 저감하고 수익을 창출할 수 있을 뿐만 아니라, 환경을 보호할 수 있다. 이러한 효과는, 최종적으로 배양육 생산을 위한 세포 배양뿐만 아니라, 다양한 세포 배양 시 성장을 촉진할 수 있는 첨가제를 저렴한 비용으로 안정적으로 공급할 수 있는 발판이 될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0053] 도 1은 본원 발명에서 가축 혈액을 이용한 FBS 대체제 생산 과정을 간략하게 나타낸 모식도이다.

도 2는 실험실에서 CO_2를 이용해 동물(닭)을 희생시켜 일반적인 동물 도축 상황을 재연한 후, 도축되는 가축에서 혈액을 획득하고 이로부터 혈청(serum) 또는 혈장(plasma)을 분리 수득하는 일련의 과정들을 나타낸 도이다.

도 3은 혈청 또는 혈장(serum/plasma)의 탈색 과정을 나타낸 도이다.

도 4는 탈색 후의 혈청 또는 혈장(serum/plasma) 용액에서 불순물을 제거하기 위한 일련의 여과 과정과 멸균 과정을 나타낸 도이다.

도 5는 동물(가축)의 근육 조직으로부터 위성세포를 분리하는 일련의 과정을 나타낸 도이다.

도 6은 소 위성 세포(Bovine cell)를 대상으로, 본 발명의 FBS 대체제(실시예 1의 방법으로 생산된 각각의 bovine plasma(BP), bovine serum(BS), chicken plasma(CP) 및 chicken serum(CS)) 사용에 따른 세포독성 유무를 확인한 결과로, 유의적으로 세포 사멸을 유발하는 세포 독성은 확인되지 않았다.

도 7은 닭 위성 세포(Chicken cell)를 대상으로, 본 발명의 FBS 대체제(실시예 1의 방법으로 생산된 각각의 bovine plasma(BP), bovine serum(BS), chicken plasma(CP) 및 chicken serum(CS)) 사용에 따른 세포독성 유무를 확인한 결과로, 유의적으로 세포 사멸을 유발하는 세포 독성은 확인되지 않았다.

도 8은 소 위성 세포(Bovine cell)를 기반으로, 세포 배양 배지에 본 발명의 FBS 대체제(실시예 1의 방법으로 생산된 각각의 bovine plasma(BP), bovine serum(BS), chicken plasma(CP) 및 chicken serum(CS))를 부분적으로 적용하여 배양된 근아세포의 성장 및 증식 정도를 나타낸 도이다(세포 성장 및 증식 배지로는 기본적으로 Ham's F-10 배지에 20%(v/v) FBS와 1%(v/v) P/S/A가 첨가된 배지(CTL, control)를 사용하였으며, 실험군으로서 본 발명의 FBS 대체제 각각을 전체 FBS양의 25%(v/v)(전체 배지 조성물의 5%(v/v)) 또는 50% (v/v)(전체 배지 조성물의 10%(v/v)) 대체한 처리구 8개로 진행함).

도 9는 소 위성 세포(Bovine cell)를 기반으로, 세포 배양 배지에 본 발명의 FBS 대체제(실시예 1의 방법으로 생산된 각각의 bovine plasma(BP), bovine serum(BS), chicken plasma(CP) 및 chicken serum(CS))를 부분적으로 적용하여 배양된 근아세포의 분화 정도를 나타낸 도이다(세포 성장 및 증식 배지로는 기본적으로 Ham's F-10 배지에 20%(v/v) FBS와 1%(v/v) P/S/A가 첨가된 배지(CTL, control)를 사용하였으며, 실험군으로서 본 발명의

FBS 대체제 각각을 전체 FBS양의 25%(v/v)(전체 배지 조성물의 5%(v/v)) 또는 50% (v/v)(전체 배지 조성물의 10%(v/v)) 대체한 처리구 8개로 진행함).

도 10은 닭 위성 세포(Chicken cell)를 기반으로, 세포 배양 배지에 본 발명의 FBS 대체제(실시예 1의 방법으로 생산된 각각의 bovine plasma(BP), bovine serum(BS), chicken plasma(CP) 및 chicken serum(CS))를 부분적으로 적용하여 배양된 근아세포의 성장 및 증식 정도를 나타낸 도이다(세포 성장 및 증식 배지로는 기본적으로 Ham's F-10 배지에 20%(v/v) FBS와 1%(v/v) P/S/A가 첨가된 배지(CTL, control)를 사용하였으며, 실험군으로서 본 발명의 FBS 대체제 각각을 전체 FBS양의 25%(v/v)(전체 배지 조성물의 5%(v/v)) 또는 50% (v/v)(전체 배지 조성물의 10%(v/v)) 대체한 처리구 8개로 진행함).

도 11은 닭 위성 세포(Chicken cell)를 기반으로, 세포 배양 배지에 본 발명의 FBS 대체제(실시예 1의 방법으로 생산된 각각의 bovine plasma(BP), bovine serum(BS), chicken plasma(CP) 및 chicken serum(CS))를 부분적으로 적용하여 배양된 근아세포의 분화 정도를 나타낸 도이다(세포 성장 및 증식 배지로는 기본적으로 Ham's F-10 배지에 20%(v/v) FBS와 1%(v/v) P/S/A가 첨가된 배지(CTL, control)를 사용하였으며, 실험군으로서 본 발명의 FBS 대체제 각각을 전체 FBS양의 25%(v/v)(전체 배지 조성물의 5%(v/v)) 또는 50% (v/v)(전체 배지 조성물의 10%(v/v)) 대체한 처리구 8개로 진행함).

도 12는 소 위성 세포(Bovine cell)를 기반으로, 세포 배양 배지 내 기존 FBS를 본 발명의 FBS 대체제(실시예 1의 방법으로 생산된 각각의 bovine serum(BS), porcine serum(PS) 및 chicken serum(CS))로 완전 대체하여, 전체 세포 배양 배지 내에 각각 20%(v/v), 30%(v/v) 또는 40%(v/v)의 각 농도 별로 첨가하여 배양된 근아세포의 성장 및 증식 정도를 나타낸 그래프이다(세포 성장 및 증식 배지로는 기본적으로 Ham's F-10 배지에 20%(v/v) FBS와 1%(v/v) P/S/A가 첨가된 배지(CTL, control)를 사용하였음).

도 13은 돼지 위성 세포(Porcine cell)를 기반으로, 세포 배양 배지 내 기존 FBS를 본 발명의 FBS 대체제(실시예 1의 방법으로 생산된 각각의 bovine serum(BS), porcine serum(PS) 및 chicken serum(CS))로 완전 대체하여, 전체 세포 배양 배지 내에 각각 20%(v/v), 30%(v/v) 또는 40%(v/v)의 각 농도 별로 첨가하여 배양된 근아세포의 성장 및 증식 정도를 나타낸 그래프이다(세포 성장 및 증식 배지로는 기본적으로 Ham's F-10 배지에 20%(v/v) FBS와 1%(v/v) P/S/A가 첨가된 배지(CTL, control)를 사용하였음).

도 14는 닭 세포(Chicken cell)를 기반으로, 세포 배양 배지 내 기존 FBS를 본 발명의 FBS 대체제(실시예 1의 방법으로 생산된 각각의 bovine serum(BS), porcine serum(PS) 및 chicken serum(CS))로 완전 대체하여, 전체 세포 배양 배지 내에 각각 20%(v/v), 30%(v/v) 또는 40%(v/v)의 각 농도 별로 첨가하여 배양된 근아세포의 성장 및 증식 정도를 나타낸 그래프이다(세포 성장 및 증식 배지로는 기본적으로 Ham's F-10 배지에 20%(v/v) FBS와 1%(v/v) P/S/A가 첨가된 배지(CTL, control)를 사용하였음).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0054] 본 발명은 가축을 도축할 때 발생하는 도축 부산물을 활용하고, 세포 성장에 필수적인 값 비싼 기존의 FBS (fetal bovine serum)를 대체하기 위한 FBS 대체제를 생산하는 방법에 관한 것이다. 기존의 FBS는 도축된 모체 안에서 사산된 소 태아에서 채취한 혈액에서 생산되었다. 이러한 생산법은 배양육 연구가 활발해 짐에 따라 증가하는 FBS의 수요를 충족하기 어려울 뿐만 아니라, 동물 윤리적인 문제를 포함하고 있다. 따라서 본 발명자들은 모체 내 태아가 아닌, 일반 가축을 도축할 때 발생하는 혈액을 활용하여 배양육 성장에 효과적인 FBS 대체제를 만드는 것에 초점을 두었다. 본 발명자들은 일반 가축을 도축할 때 발생하는 혈액을 serum과 plasma 형태로 획득하여 FBS 대체제의 형태로 만드는 방법을 고안하였다. 또한, 축종(畜種)별 가축의 근육으로부터 배양육 생산에 필요한 위성세포(satellite cell)를 획득하여, 본 발명의 FBS 대체제를 적용시켜 세포 배양을 진행하는 방법을 통해 기존 FBS와 비교하여 본 발명의 FBS 대체제의 효과를 검증하였다. 이 과정에서 소, 돼지 및 닭 유래 FBS 대체제의 개체 특이적 효과를 확인하였으며, serum 뿐만 아니라 plasma를 활용하는 방법도 가능함을 확인함과 함께, 본 발명의 FBS 대체제가 위성 세포(satellite cell)로부터 배양육 생산을 위한 근아세포(myoblast) 형성 및 성장(증식)에 효과적임을 확인하였다.

[0056] 구체적으로 본 발명의 FBS 대체제 생산을 위한 전체 과정은, 크게 부산물의 수급(혈액으로부터 serum 또는 plasma 수급), 탈색 과정, 여과 과정, 멸균 과정으로 이루어져 있다. 생산된 FBS 대체제는 bovine, porcine, chicken 으로 부터의 위성세포 배양에 적용하여 근아세포(myoblast) 성장율, 세포 독성, 세포 분화도를 확인하여 그 효과를 검증하였다. 위와 같은 과정은 도 1에 나타내어 있으며, 본 명세서 실시예들을 통해 그 상세한 과

정이 설명되어 있다.

[0058] 이에, 본 발명은

[0059] (i) 도축 시 부산물로서 인간을 제외한 동물로부터 분리된 혈액으로부터 혈청 또는 혈장을 수득하는 단계;

[0060] (ii) 상기 (i) 단계에서 수득한 혈청 또는 혈장을 탈색 하는 단계; 및

[0061] (iii) 상기 (ii) 단계에서 수득한 탈색된 혈청 또는 혈장을 여과하는 단계;

[0062] 를 포함하는, 도축 부산물로부터 배양육 배양용 배지 첨가제(FBS 대체제)를 제조하는 방법을 제공한다.

[0063] 본 발명의 일 실시양태에서, 상기 본 발명의 도축 부산물로부터 배양육 배양용 배지 첨가제를 제조하는 방법은, 당업자에게 있어서 상기 (i) 내지 (iii) 단계를 포함하는 인간을 제외한 동물로부터 FBS 대체제를 수득하는 방법으로 이해되는 것임이 자명할 것이다.

[0064] 본 발명의 일 실시양태에서, 상기 동물은 인간을 제외한 포유류라면 그 종류가 특별히 제한되지 않으나, 바람직한 일 실시양태에서 가축 종류일 수 있다. 구체적 일 실시양태에서, 상기 가축은 이에 제한되지 않으나 소, 돼지 및 닭으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.

[0065] 상기 (i) 단계에서 혈액(혈청 및 혈장)은, 해당 동물(가축)의 도축 시 수득되는 것으로, 각 동물의 도축 연령은 당업계에 잘 알려져 있다.

[0066] 본 발명의 구체적 일 실시양태에서, 도축 동물이 소인 경우에, 바람직하게 상기 소는 30 내지 48개월령(month age)인 것일 수 있고, 더욱 바람직하게는 상기 소는 33 내지 46개월령(month age)인 것일 수 있다.

[0067] 본 발명의 구체적 일 실시양태에서, 도축 동물이 닭인 경우에, 바람직하게 상기 닭은 2 내지 8주령(week age)인 것일 수 있고, 더욱 바람직하게는 상기 닭은 2 내지 6주령(week age)인 것일 수 있다.

[0068] 본 발명의 구체적 일 실시양태에서, 도축 동물이 돼지인 경우에, 바람직하게 상기 돼지는 180일령(day age)인 것일 수 있다. 한국에서 돼지 도축일령은 180일령으로 고정되어 있다.

[0069] 본 발명의 일 실시양태에서, 바람직하게 상기 (i) 단계에서 도축 시 부산물로서 인간을 제외한 동물로부터 분리된 혈액(전혈, whole blood)은, 항응고제 처리되는 것일 수 있다. 상기 항응고제는 당업계에 공지된 것이라면, 그 종류가 특별히 제한되지 않으며, 일례로 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA), 에틸렌글리콜테트라아세트산(EGTA), 시트레이트, 시트레이트염디에틸렌트리아민 펜타아세트산(DTPA), 1,2-디아미노시클로헥산 테트라아세트산(DCTA), 헤파린, 와파린 및 옥살레이트로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 것일 수 있다.

[0070] 본 발명에서, 상기 (i) 단계에서는 도축 시 부산물로서 인간을 제외한 동물로부터 분리된 혈액(전혈, whole blood)으로부터, 혈청 또는 혈장을 분리 수득한다. 전혈로부터 혈청 또는 혈장을 분리하는 방법은 당업계에 주지되어 있으며, 본 발명에서 그 방법이 특별히 제한되지 않는다. 일례로 당업계에는 원심분리를 이용하는 방법, 혈청 또는 혈장 분리용 겔을 이용하는 방법 및 이를 위한 상용화된 제품들이 공지되어 있다.

[0072] 본 발명의 일 실시양태에서, 상기 (ii) 단계의 탈색은, 상기 (i) 단계에서 수득한 혈청 또는 혈장에 고령토(kaolin)를 혼합하는 것에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.

[0073] 본 발명의 일 실시양태에서, 상기 (ii) 단계의 탈색은, 바람직하게 50 내지 70 ℃ 온도에서 수행되는 것을 특징으로 하는 것일 수 있고, 더욱 바람직하게는 55 내지 65 ℃에서 수행되는 것일 수 있다.

[0074] 본 발명의 일 실시양태에서, 상기 (ii) 단계의 탈색은 혈액 또는 혈장의 양(amount) 또는/및 당업자가 목적하는 탈색 효율에 따라 시간 또는/및 교반 등의 조건을 당업자가 적절하게 적의 선택 및 변경하여 사용할 수 있다.

[0076] 본 발명의 일 실시양태에서, 바람직하게 상기 (iii) 단계의 여과 과정은, 직경 0.05 내지 0.3 ㎛ 크기 공극으로 여과하는 것을 특징으로 한다. 이에 제한되지 않으나, 일례로 상기 공극의 크기는 직경 0.05㎛, 0.1㎛, 0.15㎛, 0.2㎛, 0.25㎛ 또는 0.3㎛ 일 수 있으며, 이들에서 선택되는 두개의 값을 경계(상한 및 하한)로 하는 범위를 본 발명에서 모두 포함한다. 이때, 상기 여과 과정은 직경 2㎛ 내지 25㎛ 크기 공극으로 사전 여과하는 과정을

추가로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0077] 본 발명에서 상기 여과는 당업계에 공지된 여과 수단이라면 그 종류가 특별히 제한되지 않는다. 본 발명의 바람직한 일 실시양태에서, 상기 여과는 멤브레인 필터(Membrane Filter) 여과인 것을 특징으로 하는 것일 수 있으며, 이때 필터 페이퍼(filter paper), 시린지 필터(Syringe Filter) 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 방법의 여과를 추가적으로 수행할 수 있다.

[0079] 본 발명의 일 실시양태에서, 상기 본 발명의 도축 부산물로부터 배양육 배양용 배지 첨가제(FBS 대체제)를 제조하는 방법은, 상기 (iii) 단계에서 여과 과정 이후에 멸균 과정을 추가로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0080] 본 발명의 구체적 일 실시양태에서, 상기 멸균은, 당업계에 알려진 혈액, 혈청 또는 혈장의 멸균 방법을 사용하는 것이라면, 본 발명에서 그 멸균 방법이 특별히 제한되지 않는다. 이에 제한되지 않으나, 일례로 본 발명의 배양육 배양용 배지 첨가제(FBS 대체제) 내의 유효 성분들이 파괴되지 않는, 저온 멸균, 방사선 조사 등의 멸균법을 사용할 수 있다. 본 발명의 일 실시 양태에서, 상기 멸균은 50 내지 70 ℃ 온도에서 수행되는 것일 수 있으며, 혈액 또는 혈장의 양(amount) 또는/및 당업자가 목적하는 멸균 효율에 따라 시간 등의 조건을 당업자가 적절하게 적의 선택 및 변경하여 사용할 수 있다.

[0082] 또한 본 발명은, 상기 본 발명의 제조 방법(도축 부산물로부터 배양육 배양용 배지 첨가제(FBS 대체제)를 제조하는 방법)으로 제조된, 배양육 배양용 배지 첨가제(본 발명의 FBS 대체제)를 제공한다.

[0083] 본 발명의 일 실시양태에서, 상기 본 발명의 배양육 배양용 배지 첨가제는, 근육 위성세포(satellite cell) 증식용 배지 첨가제인 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.

[0084] 본 발명의 일 실시양태에서, 상기 본 발명의 배양육 배양용 배지 첨가제는, 소태아혈청(FBS)을 대체하거나 또는 소태아혈청(FBS)과 병행하여 사용되는 것을 특징으로 하는 것 일 수 있다. 구체적으로, 상기 본 발명의 배양육 배양용 배지 첨가제는 소태아혈청(FBS) 대체체로서 제공되거나, FBS(Fetal bovine serum)에 본 발명의 배양육 배양용 배지 첨가제가 추가로 첨가되어 제조된 제제로서 제공되는 것일 수 있다.

[0085] 상기 소태아혈청(FBS)과 병행(병용) 예에 있어서, 본 발명의 배양육 배양용 배지 첨가제는, 기존에 세포 배양 배지에 첨가되는 소태아혈청(FBS)의 양(amount, 중량, 부피 등)을 100%로 볼 때, 이를 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 대체하여 병용되는 것일 수 있다. 이때, 상기 % 표시는'%(v/v)'를 의미하는 것일 수 있으며, 부피부(부피비)로도 이해된다.

[0087] 또한 본 발명은, 상기 본 발명의 배양육 배양용 배지 첨가제(FBS 대체제)를 포함하는 배양육 배양용 배지 조성물을 제공한다.

[0088] 본 발명의 일 실시양태에서, 상기 본 발명의 배양육 배양용 배지 조성물은, 근육 위성세포(satellite cell) 증식용인 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.

[0089] 본 발명의 일 실시양태에서, 상기 본 발명의 배양육 배양용 배지 조성물은, 무혈청 배지 100 중량부에 대하여, 상기 본 발명의 배양육 배양용 배지 첨가제(FBS 대체제)를 1 내지 20 중량부; 및 항생제/항균제 0.5 내지 1.5 중량부를 포함하는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.

[0090] 본 발명의 일 실시양태에서, 상기 본 발명의 배양육 배양용 배지 조성물은, 무혈청 배지 100 부피부(부피비)에 대하여, 상기 본 발명의 배양육 배양용 배지 첨가제(FBS 대체제)를 1 내지 20 부피부; 및 항생제/항균제 0.5 내지 1.5 부피부를 포함하는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.

[0092] 본 발명의 일 실시양태에서, 상기 본 발명의 배양육 배양용 배지 조성물은 FBS를 포함하지 않고, FBS 대신에 본 발명의 배양육 배양용 배지 첨가제가 FBS를 완전 대체한 형태로 사용될 수 있다.

[0093] 이러한 본 발명의 바람직한 구체적 일 실시양태에서, 본 발명의 배양육 배양용 배지 첨가제(FBS 대체제)가 소로부터 제조된 경우에는, 배지 조성물 내에, 무혈청 배지 100 중량부(부피부)에 대하여, 20 내지 40 중량부(부피부) (더욱 바람직하게는 20 내지 30 중량부(부피부))로 포함되는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다. 또한 본 발명의 배양육 배양용 배지 첨가제(FBS 대체제)가 소로부터 제조된 경우에는, 소 또는 닭으로부터 유래된 근육 위성세포 배양 시에 사용하는 것이 바람직할 수 있다.

[0094] 그리고 본 발명의 배양육 배양용 배지 첨가제(FBS 대체제)가 닭으로부터 제조된 경우에는, 배지 조성물 내에, 무혈청 배지 100 중량부(부피부)에 대하여, 20 내지 40 중량부(부피부) (더욱 바람직하게는 30 내지 40 중량부(부피부))로 포함되는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다. 또한 본 발명의 배양육 배양용 배지 첨가제(FBS 대체제)가 닭으로부터 제조된 경우에는, 돼지 또는 닭으로부터 유래된 근육 위성세포 배양 시에 사용하는 것이 바람직할 수 있다.

[0095] 그리고 본 발명의 배양육 배양용 배지 첨가제(FBS 대체제)가 돼지로부터 제조된 경우에는, 배지 조성물 내에, 무혈청 배지 100 중량부(부피부)에 대하여, 20 내지 40 중량부(부피부)로 포함되는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다. 또한 본 발명의 배양육 배양용 배지 첨가제(FBS 대체제)가 돼지로부터 제조된 경우에는, 소, 돼지 또는 닭으로부터 유래된 근육 위성세포 배양 시에 사용하는 것이 바람직할 수 있다.

[0096] 본 발명의 일 실시양태에서, 상기 무혈청 배지는 당업계에 세포 배양에 사용되는 것으로 공지된 것이라면 그 종류가 특별히 제한되지 않으며, 일례로 Ham's (F)10 medium, Ham's (F)12 medium, DMEM(Dulbecco Modified Eagle Medium), MEM(Minimum Essential Medium), MCDB-201 medium 및 RPMI 1640 medium 중에서 선택된 어느 하나 이상의 것을 사용할 수 있다.

[0097] 본 발명의 일 실시양태에서, 상기 항생제/항균제는, 당업계에 세포 배양에 사용되는 것으로 공지된 것이라면 그 종류가 특별히 제한되지 않으며, 페니실린 및 스트렙토마이신 중에서 선택된 1종 이상의 항생제; 및 암포테리신-B, 클로트리마졸, 미코나졸, 케토코나졸 및 니스태틴 중에서 선택된 1종 이상의 항진균제를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0099] 본 발명의 일 실시양태에서, 상기 본 발명의 배양육 배양용 배지 조성물은, 추가적으로 소태아혈청(FBS)을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 즉, 본 발명의 일 실시양태에서, 상기 본 발명의 배양육 배양용 배지 조성물은, 본 발명의 배양육 배양용 배지 첨가제(본 발명의 FBS 대체제)가 소태아혈청(FBS)과 병용된 형태로 사용될 수 있다.

[0100] 이러한 일 구현예에서, 본 발명의 배양육 배양용 배지 조성물은, 무혈청 배지 100 중량부(부피부)에 대하여, 본 발명의 배양육 배양용 배지 첨가제(FBS 대체제)를 10 내지 20 중량부(부피부); 소태아혈청(FBS)을 0 내지 20 중량부(부피부); 및 항생제/항균제 0.5 내지 1.5 중량부(부피부)를 포함하는 것을 특징으로 하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0102] 또한 본 발명은, 상기 본 발명의 배양육 배양용 배지 조성물을 이용하여 근육 위성세포를 증식(배양)하는 단계;를 포함하는 배양육의 제조방법을 제공한다. 구체적 일 실시양태에서 본 발명은, 본 발명의 배양육 배양용 배지 조성물이 담겨있는 배양 용기 내에서 근육 위성세포를 배양하는 단계;를 포함하는 배양육의 제조방법을 제공한다. 본 발명의 바람직한 일 실시양태에서, 상기 근육 위성세포는 마트리겔(Matrigel) 코팅된 배양용기(ex, plate, dish 등)에서 배양되는 것일 수 있다.

[0103] 본 발명에서 상기 근육 위성세포는, 이것이 수득되는 동물의 종류 및 상기 동물의 연령이 특별히 제한되지 않고, 당업계에 공지된 방법에 따라 수득될 수 있다. 본 발명의 일 실시양태에서, 근육 위성세포는 상기 본원 발명의 도축 부산물로부터 배양육 배양용 배지 첨가제를 제조하는 방법 중 상기 (i) 단계에서 도축 시에 수득되는 것일 수 있다.

[0105] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예 및 실험예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예 및 실험예

는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예 및 실험예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0107] **실시예 1. 도축 부산물로부터 본 발명의 FBS(fetal bovine serum) 대체체의 수득**

[0108] **(공정 1) 동물 도축 부산물 중 혈액 수급 후, 혈청(serum) 및 혈장(plasma) 수득**

[0109] 가축을 도축하며 혈액을 수급하였다. 구체적으로 소 혈액은 45개월령의 암소를 도축하면서 수급하였고, 닭 혈액은 약 6주령의 산란계(영계)를 도축하면서 수급하였으며, 돼지 혈액은 180일령의 암돈을 도축하여 수급하였다.

[0110] 심혈 채취가 가능한 경우, EDTA(항응고제) 또는 coagulant gel 처리가 되어있는 tube를 활용하여 혈액을 획득하였다. 심혈 채취가 불가능한 경우, Na-EDTA를 녹인 용액이 들어있는 바틀(bottle)을 이용하여 획득하였다.

[0111] 얻어진 혈액은, 응고가 된 혈액의 액체부분만을 획득하여 3,000 rpm에서 10~ 20분간 원심분리 진행하여 상층액을 획득하였다(serum 수득).

[0112] 항응고제 처리가 된 혈액은 3,000 rpm에서 10 ~ 20분간 원심분리를 진행하여 상층액을 획득하였다(plasma 수득). 획득한 serum/plasma(serum 또는 plasma를 의미함) 형태의 혈액은 -10 ~ -20 ℃ 조건에서 냉동하여 보관하였다.

[0113] 도 2는 상기 공정 1(즉 도축된 동물로부터 혈액을 채취하고, 이로부터 serum/plasma를 획득하는 일련)의 과정들을 간략히 보여준다.

[0115] **(공정 2) serum/plasma 탈색**

[0116] serum/plasma(50ml tube)를 1X PBS(phosphate buffer saline)와 1:5~10의 비율로 혼합한 뒤, 음파처리기(sonication)를 이용하여 균질화하였다. 이후 혼합 용액에 3 ~ 5% (v/v) kaolin(고령토)을 넣고 55 ~ 65 ℃ 항온수조에서 흔들어주며 30분간 반응시켰다.

[0117] 도 3은 상기 공정 2의 과정들을 간략히 보여준다.

[0119] **(공정 3) 여과 및 멸균**

[0120] Kaolin 및 불순물을 제거하기 위해, 사전 여과로서 다양한 크기의 필터페이퍼(공극(poresize) 직경 최소 2㎛ ~ 25㎛를 사용하여)를 이용하여 여과하였다. 추가적으로 0.2 ㎛의 시린지 필터를 이용한 여과가 진행될 수 있으며, 최종 여과 과정으로 0.1 ㎛멤브레인 필터를 이용한 여과를 진행한 뒤, 15/50 ml 용량으로 튜브에 소분하였다.

[0121] 소분된 튜브는 파라필름(Parafilm)으로 밀봉한 뒤 65℃ 항온수조에서 흔들어주며 30분 ~ 1시간 동안 반응시켜 멸균하였다.

[0122] 생산된 FBS 대체제는 튜브 형태로 -10 ~ -20 ℃ 조건에서 냉동하여 보관하였다.

[0123] 도 4는 상기 공정 3의 과정들을 간략히 보여준다.

[0125] **실시예 2. 동물 근육으로부터 위성세포(satellite cells) 분리**

[0126] 배양육 생산 시 사용되는 위성 세포를 획득하기 위한 단계로서, 동물의 근육 조직을 채취하여, 상기 근육 조직을 항생제(1 ~ 3%(v/v) penicillin/streptomycin)가 섞인 1X PBS 용액에서 다져주며(잘게 조각내며) 핏물과 지방, 결체조직과 같은 불순물들을 제거하였다. 그 후, Tube로 옮겨진 조직에 collagenase D(11088858001, Sigma Aldrich, USA)와 dipase II (4942074800, Roche, Swiss)를 혼합한 효소액을 넣고 37℃에서 30분 ~ 1시간 동안 반응시켜 단백질을 분해하였다. 반응이 완료되면 1X PBS 용액을 첨가하여 효소 반응을 멈춰주고, 소화되지 않은(분해되지 않은) 조직을 걸러내고 세포를 수득하기 위해 각각 100㎛, 70㎛, 40㎛ 크기의 스트레이너(strainer)를 이용하여 순차적으로 필터링하였다. 필터링된 세포 용액은, 원심분리를 통해 상층액을 제거하고, 세포 펠렛을 수득한다. 배지(Ham's F-10 (11550043, Gibco, USA))에 펠렛을 풀어 1 ~ 2시간동안 인큐베이터에서 방치하

였다. 방치 후 상층액만을, matrigel 코팅된 디쉬에 옮겨 담고, 여기에 성장인자(bFGF, 354060, Corning, USA)와 배지를 추가하여 배양하였다. 세포를 배양하는 배지는 Ham's F-10 (11550043, Gibco, USA)를 기반으로 20%(v/v)의 FBS(35-015-CV, Corning, USA)와 1%(v/v)의 P/S/A(03-033-1B, Biological Industries, Israel)가 첨가된 배지를 사용하였다. 도 5는 동물의 근육 조직으로부터 위성세포를 분리하는 일련의 과정들을 간략히 보여준다.

[0128] **실시예 3. 본 발명의 FBS(fetal bovine serum) 대체제를 이용한 배양육의 생산**

[0129] **3-1. 본 발명의 FBS 대체제의 세포독성 확인**

[0130] 상기 실시예 1에서 생산된 본 발명의 FBS 대체제의 세포 독성을 확인하기 위해, MTT assay 분석법으로 실험하였다. 분석을 위한 MTT 시약 제조에는 Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide(sigma M 2128)를 사용하였다. 분석을 위해 matri gel이 코팅된 96 well plate에, 상기 실시예 2에서 수득한 각 위성 세포를 $1x10^4$ cells씩 넣고, 농도별로 제조된 FBS 대체 배지를 넣어 배양하였다.

[0131] 실험은 일반 배지 조성물[Ham's F-10 + 20%(v/v) FBS + 1%(v/v) P/S/A]을 사용한 CTL(control)과, 실시예 1의 방법으로 생산된 각각의 bovine plasma(BP), bovine serum(BS), chicken plasma(CP) 및 chicken serum(CS)을, 전체 FBS양의 25%(v/v) (전체 배지 조성물의 5%(v/v)) 또는 50%(v/v) (전체 배지 조성물의 10%(v/v)) 대체한 처리구 8개로 진행하였다.

[0132] 2~3일 후 세포가 충분히 성장하면, 상층액을 제거하였다. 암실 조건에서 5mg/ml(in 1X PBS)로 제조된 MTT 시약을 배지(media, Ham's F-10)와 1:9의 비율로 희석하여 첨가하였다. Plate를 호일로 감싸고 37℃ 5% CO_2 incubator에서 4시간 동안 반응시켰다. 이후 첨가된 상층액을 제거하고, DMSO를 넣어 다시 한번 암실 조건에서 10분~15분간 반응시킨 뒤, ELISA 리더기를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0133] 전체 처리구에서, 본 발명의 FBS 대체제(실시예 1의 방법으로 생산된 각각의 bovine plasma(BP), bovine serum(BS), chicken plasma(CP) 및 chicken serum(CS)) 사용에 따른 세포 독성 실험 결과는 도 6 및 도 7에 나타낸 바와 같다. Bovine cell과 Chicken cell을 이용한 실험 모두에서 FBS 대체제를 첨가하였을 때, 유의적으로 세포 사멸을 유발하는 세포 독성은 확인되지 않았다. 대부분의 처리구에서 CTL과 유사하거나 조금 높은 세포 생장이 확인되었기 때문에, 본 발명의 실시예 1의 제조법으로 만들어진 FBS 대체제를 세포 배양에 사용할 수 있다고 판단되었다.

[0135] **3-2. 본 발명의 FBS 대체제를 활용한 근아세포 성장 촉진 효과 확인 _ 성장(증식) 배지 내 기존 FBS의 대체물로서 부분적으로 본 발명의 FBS 대체제 사용**

[0136] 상기 실시예 3-1에서 각각의 세포(Bovine cell과 Chicken cell)가 성장한 뒤에, 배지를 교체하여 분화를 유도하여, 세포 성장에 따른 분화도를 확인하였다.

[0137] 세포 성장 및 증식 배지로는 기본적으로 Ham's F-10 배지에 20%(v/v) FBS와 1%(v/v) P/S/A가 첨가된 배지(CTL, control)를 사용하였으며, 실험군으로서 실시예 1의 방법으로 생산된 각각의 bovine plasma(BP), bovine serum(BS), chicken plasma(CP) 및 chicken serum(CS)을 전체 FBS양의 25%(v/v)(전체 배지 조성물의 5%(v/v)) 또는 50% (v/v)(전체 배지 조성물의 10%(v/v)) 대체한 처리구 8개로 진행하였고, 세포 성장도에 따라 3~7일간 배양하여 측정하였다.

[0138] 세포 분화 배지는 DMEM 배지에 2%(v/v) Horse serum 및 1%(v/v) P/S/A을 첨가하여 제조하였으며, 세포의 분화에 따라 3~5일동안 배양 후 측정하였다.

[0140] 세포 배양 결과 세포 성장, 증식 및 분화 정도를 도 8 및 도 9에서 보여준다. 도 8 및 도 9에서 확인할 수 있는 바와 같이, bovine cell을 기반으로 배양된 근아세포는 대조구(CTL)와 비교하여 CS 처리구가 가장 많이 증식한 것이 확인되었다. Plasma(BP 및 CP)와 serum(BS 및 CS)을 비교하였을 때, 소 혈액 및 닭 혈액 모두 serum에서 더 많은 세포의 증식이 확인 되었으며, 소 혈액에 비해 닭 혈액을 사용한 처리구에서 더 많은 세포 증식이 일어났음을 확인하였다. 그 중에서 BP의 세포 증식률은 가장 낮게 나타났으며, 이외 처리구의 증식 수준은 유사하였

다. 이에 따라 증식된 세포를 분화시켰을 때, 세포의 밀도는 비교적 적지만, 모든 대체제 처리구에서 대조구와 유사한 형태로 세포가 분화된 것을 확인할 수 있었다.

[0141] 또한 도 10 및 도 11에서 확인할 수 있는 바와 같이, Chicken cell을 기반으로 배양된 근아세포의 경우에도 CS 처리구가 가장 많은 세포 증식이 이루어졌으며, bovine cell에서 보다 더 많은 양의 세포 성장을 확인하였다. 특히 대조구(CTL)인 FBS 20%(v/v) 첨가 배지에서보다 더 많은 세포 성장이 이루어 진 것을 확인할 수 있었다. 이에 따라 chicken cell에 CS를 처리한 그룹의 세포 분화도는 CTL과 유사한 것을 확인할 수 있었으며, 이외 처리구 또한 밀도가 비교적 적지만, 대조구와 유사한 형태로 세포의 독성 없이 분화된 것을 확인하였다. 또한 앞 실험과 마찬가지로 plasma(BP 및 CP)보다는 serum(BS 및 CS)에서, 소보다는 닭 혈액에서 세포 성장이 더 우세한 것을 확인할 수 있었다.

[0142] 이와 같은 결과를 종합하면, 대조구(CTL)의 FBS보다, 닭 혈액(CP 및 CS)을 사용하였을 때 chicken cell의 성장 및 증식을 눈에 띄게 증가시킬 수 있음을 나타낸다.

[0143] 가축이 도축되는 연령에 획득할 수 있는 혈액을 활용하였기 때문에, bovine cell에서는 이와 같은 경향이 뚜렷하게 나타나지 않은 것으로 판단된다. 이에 대한 근거로 소 태아의 혈청이 첨가된 배지를 활용한 bovine cell 실험의 대조구는 가장 우수한 세포 성장 및 증식이 확인되었다.

[0145] **3-3. 본 발명의 FBS 대체제를 활용한 근아세포 성장 촉진 효과 및 세포 독성 확인 _ 성장(증식) 배지 내 기존 FBS의 완전(100%) 대체물로서 본 발명의 FBS 대체제 사용**

[0146] 대표 가축 3종(소, 돼지, 닭)의 혈액으로부터, 실시예 1의 방법으로 생산된 각각의 FBS 대체제(bovine serum(BS), porcine serum(PS) 및 chicken serum(CS))를 이용하여, 근아세포 분화 및 증식(성장)에 대한 효과를 확인하였다. 상기 실시예 2에서 수득한 각 위성세포(소, 돼지, 닭)를 이용하고, 세포 성장 및 증식 배지 내의 FBS를 완전 대체(100% 대체)한 것 이외에는, 상기 실시예 3-2와 동일한 방법으로 세포를 배양하였다. MTT assay는 상기 실시예 3-1에 기재된 것과 동일한 측정방식으로 수행되었다.

[0148] 도 12에서 확인할 수 있는 바와 같이, Bovine cell에서 BS와 PS는 FBS와 동량인 20%(v/v)를 첨가하였을 때, FBS를 충분히 대체할 수 있음이 나타났다. 반면 CS는 30%(v/v)까지 대체하였을 때 약 70%의 세포 생존률을 나타났으며, 그 이상의 첨가는 오히려 부정적인 결과를 나타냈다.

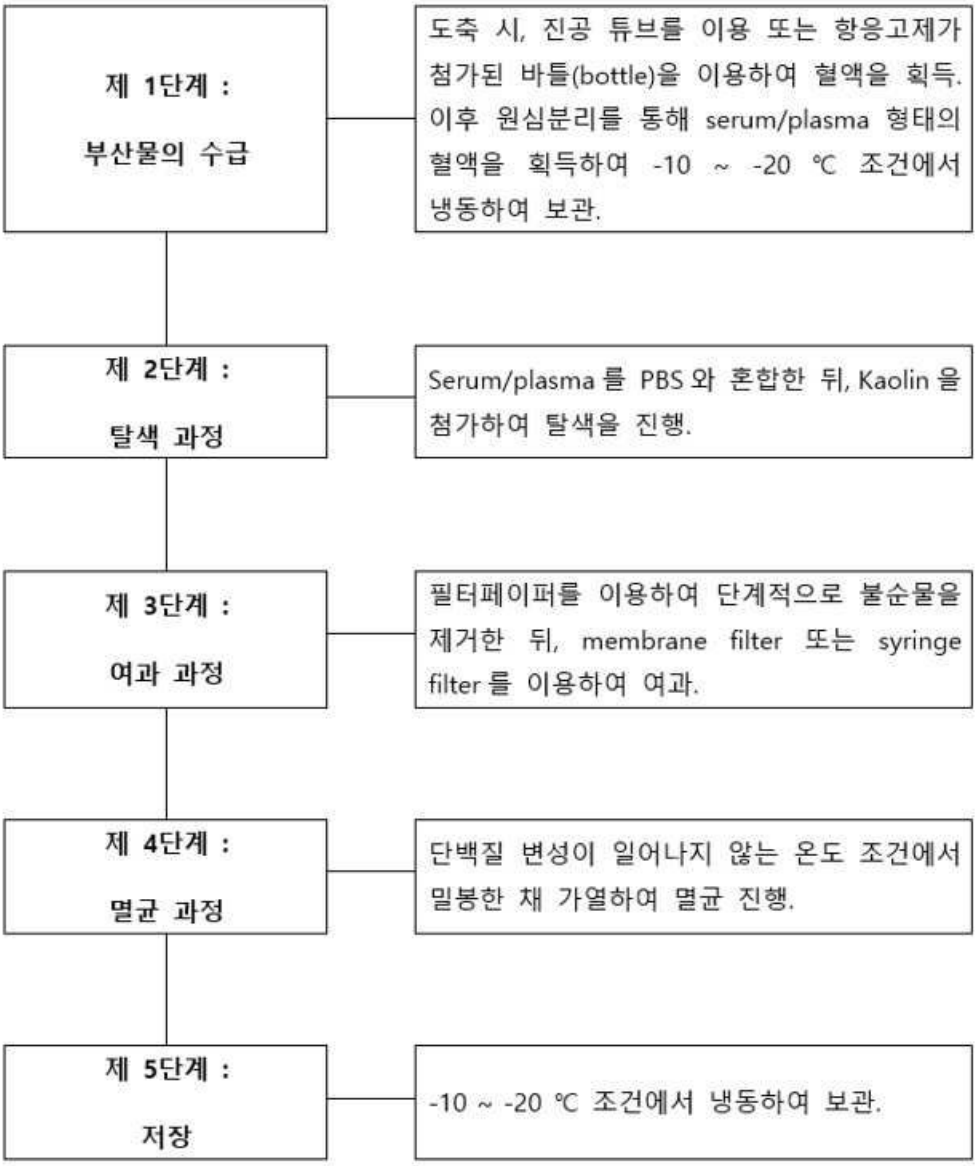
[0149] 도 13에서 확인할 수 있는 바와 같이, Porcine cell에서는 BS 또는 CS를 20%(v/v) 첨가하였을 때, FBS와 거의 유사한 정도까지 세포가 생존하였다. 그 이상의 첨가는 첨가량 대비 세포 생존율의 증가가 효과적이지 않았다. PS의 경우에는 30%(v/v) 첨가시 FBS보다 약 1.4배 높은 효과를 나타냈다.

[0150] 도 14에서 확인할 수 있는 바와 같이, Chicken cell에서는 모든 처리구가 20%(v/v) 첨가시 FBS와 유사하거나 조금 높은 세포 생존률을 나타냈다. BS와 CS의 경우에는 30%(v/v)까지 첨가량을 증가시켰을 때 세포 생존율을 조금 더 높일 수 있었다.

[0152] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 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.

도면

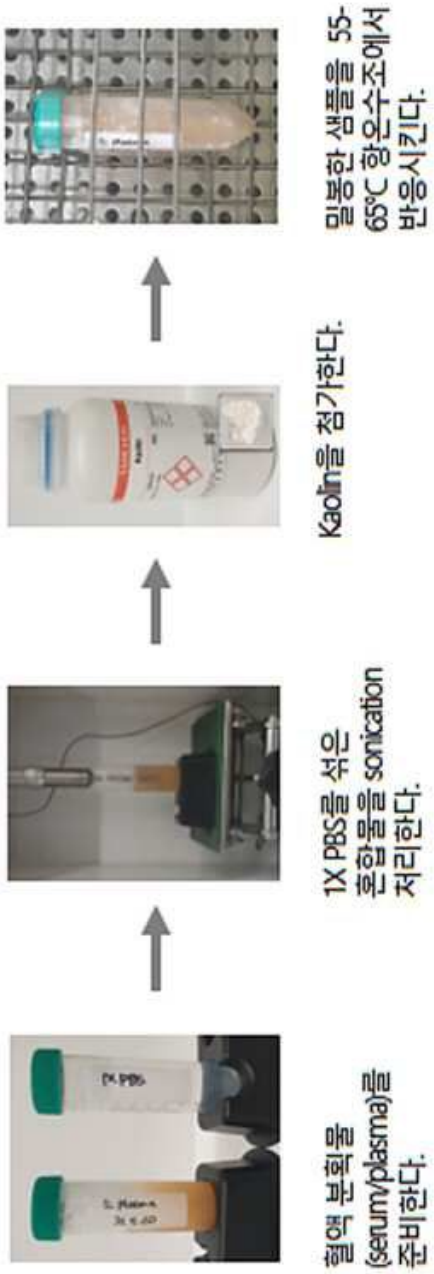
도면1


제 1단계 :
부산물의 수급
도축 시, 진공 튜브를 이용 또는 항응고제가 첨가된 바틀(bottle)을 이용하여 혈액을 획득. 이후 원심분리를 통해 serum/plasma 형태의 혈액을 획득하여 -10 ~ -20 ℃ 조건에서 냉동하여 보관.
제 2단계 :
탈색 과정
Serum/plasma 를 PBS 와 혼합한 뒤, Kaolin 을 첨가하여 탈색을 진행.
제 3단계 :
여과 과정
필터페이퍼를 이용하여 단계적으로 불순물을 제거한 뒤, membrane filter 또는 syringe filter 를 이용하여 여과.
제 4단계 :
멸균 과정
단백질 변성이 일어나지 않는 온도 조건에서 밀봉한 채 가열하여 멸균 진행.
제 5단계 :
저장
-10 ~ -20 ℃ 조건에서 냉동하여 보관.

도면2


CO2를 이용하여 희생한
동물을 개복한다
진공 채혈 튜브를 이용
하여 심혈을 채취한다.
Plasma 획득 튜브의 경우
혈액이 항응고제와 반응할
수 있도록 inverting 해준다.
3000 rpm에서 15분간
원심분리 진행한 뒤,
상층액을 취해 냉동
보관한다.

도면3


혈액 분획물
(serum/plasma)를
준비한다.
1X PBS를 섞은
혼합물을 sonication
처리한다.
Kaolin을 첨가한다.
밀봉한 샘플을 55-
65℃ 항온수조에서
반응시킨다.

도면4

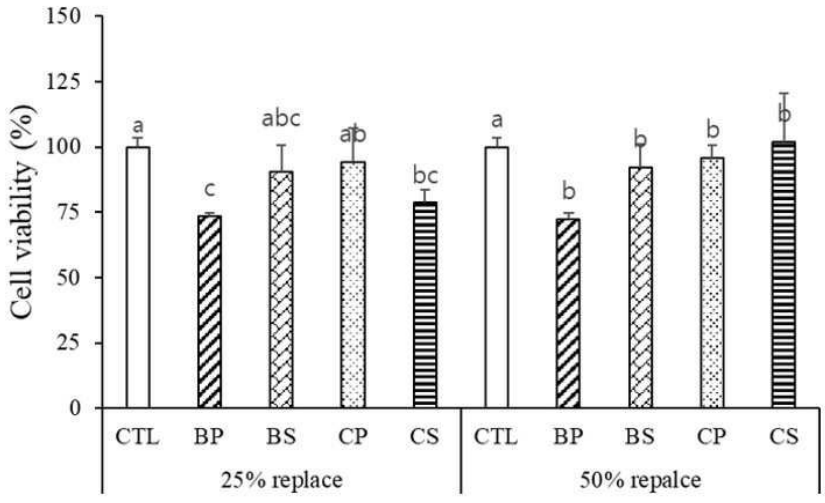

Pore size 크기별 filter paper를 준비한다.
순차적으로 용액을 여과한다.
진공 펌프를 이용하여 0.2 μm membrane filter 여과를 진행한다.
밀봉한 샘플을 65℃ 항온수조에서 반응시킨다.

도면5



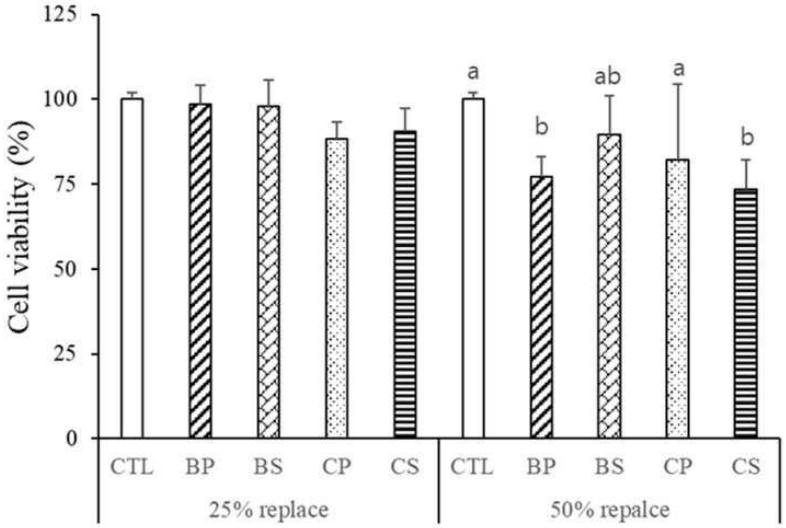
도면6

Bovine cell

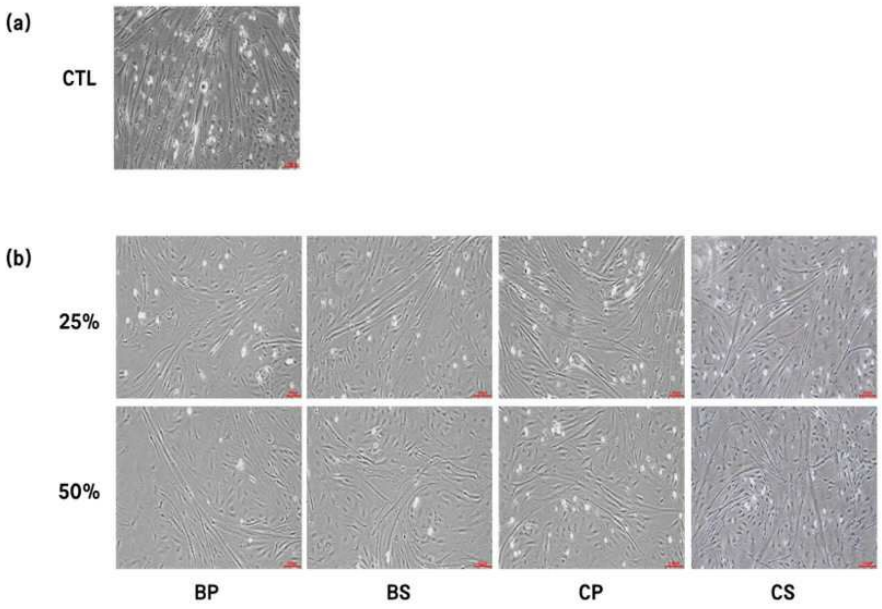


도면7

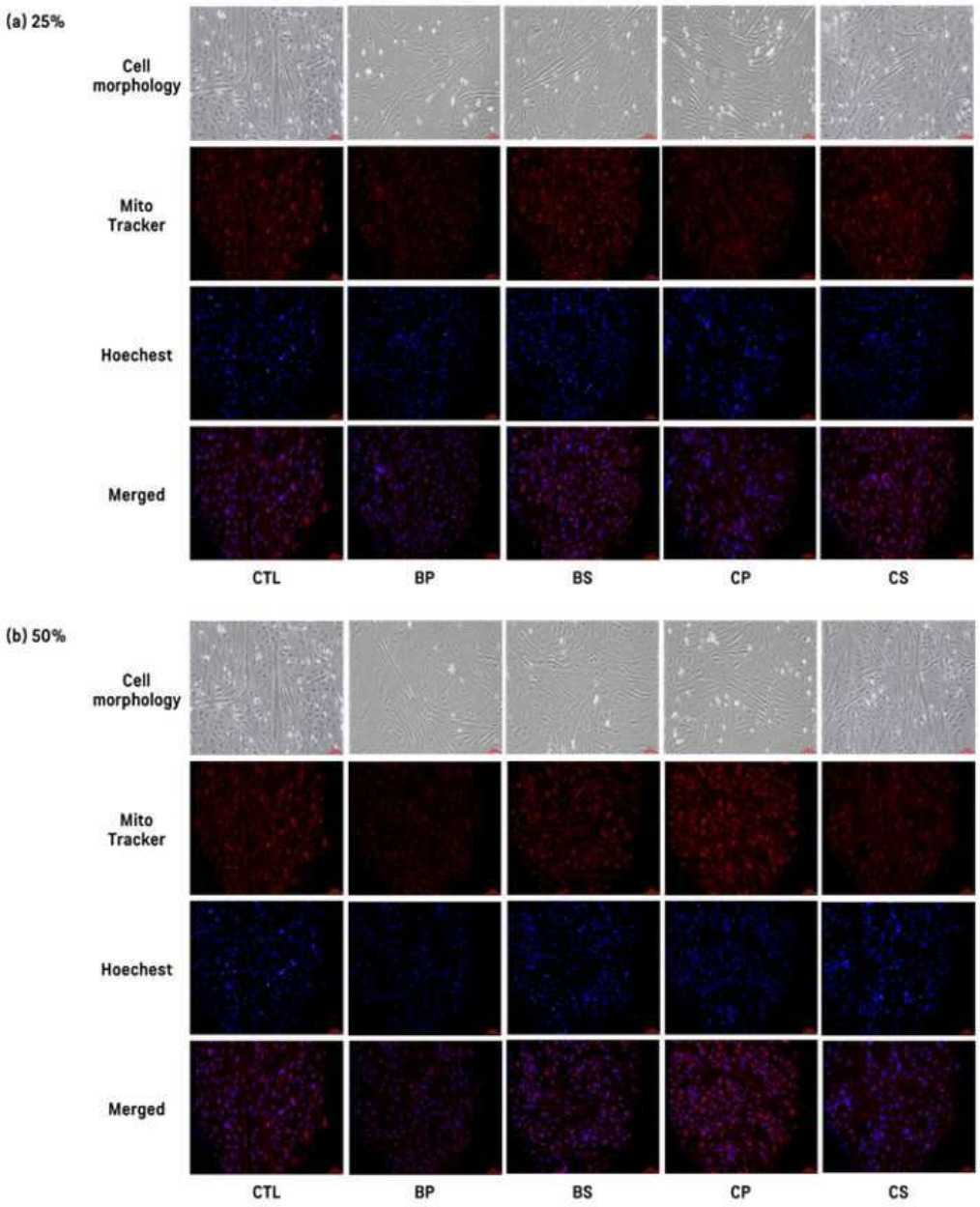
Chicken cell



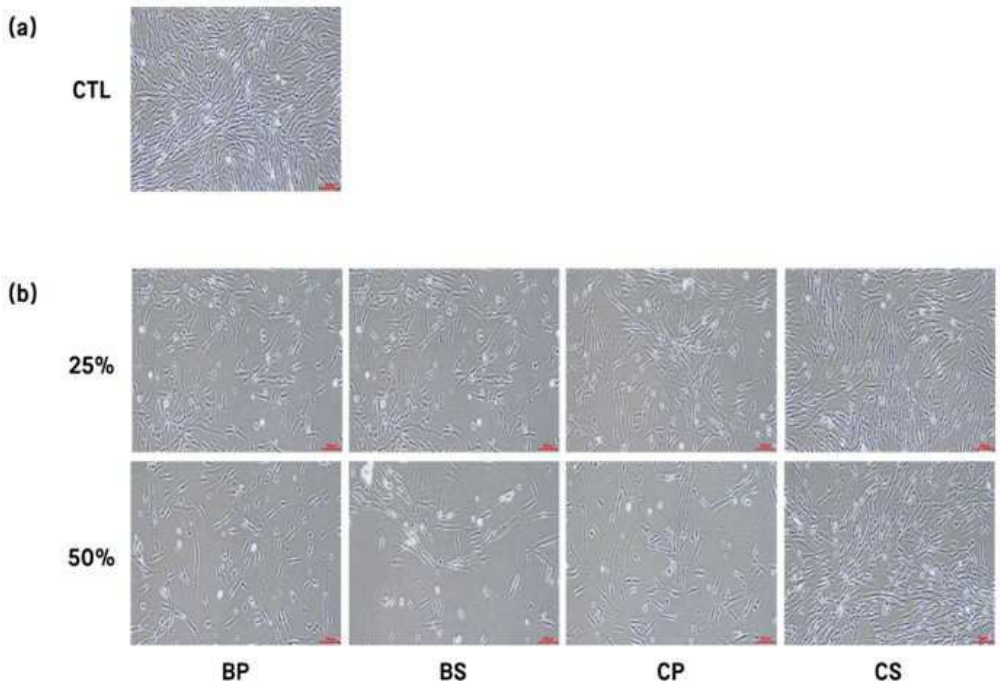
도면8



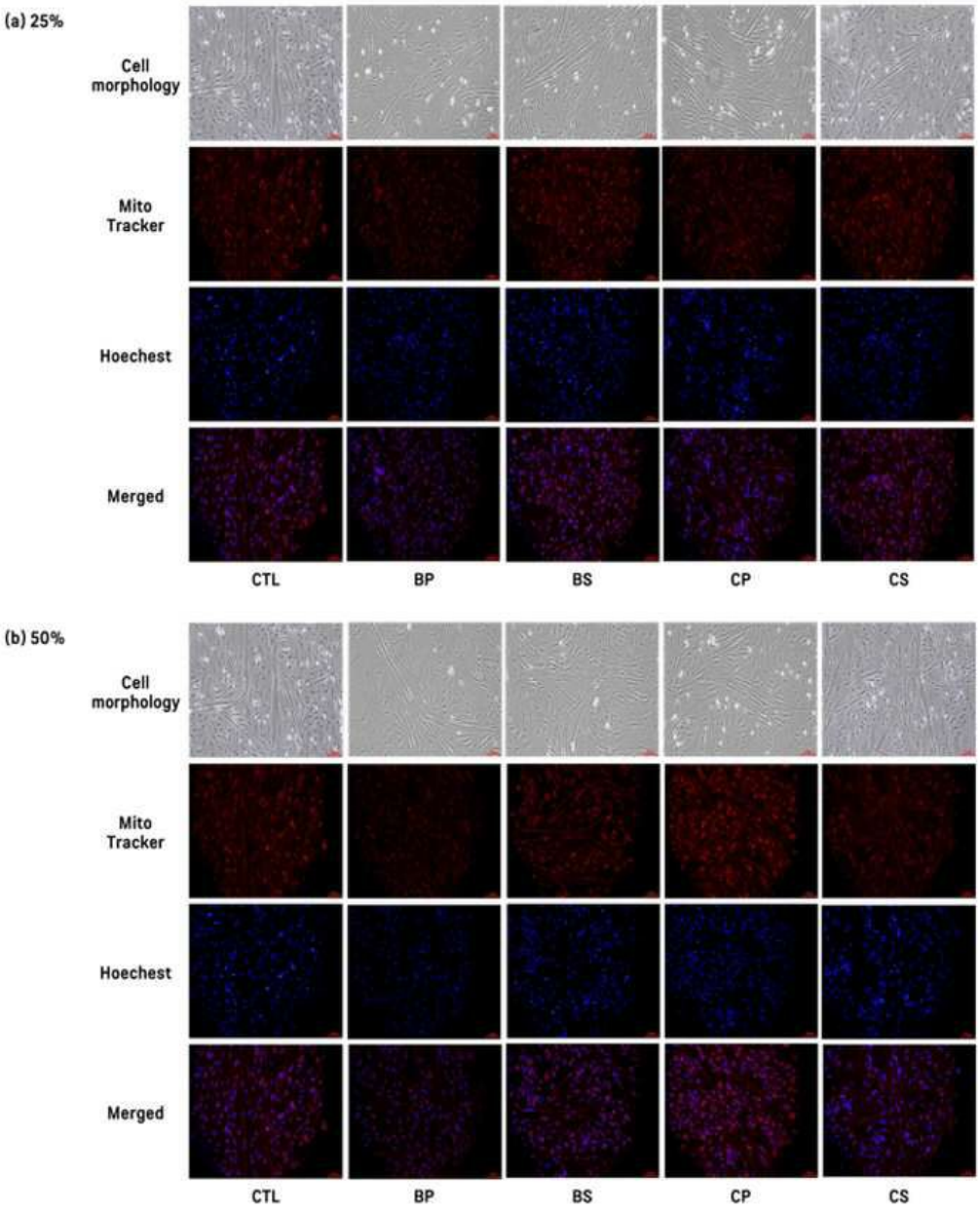
도면9


(a) 25%
Cell morphology
Mito Tracker
Hoechest
Merged
CTL
BP
BS
CP
CS
(b) 50%
Cell morphology
Mito Tracker
Hoechest
Merged
CTL
BP
BS
CP
CS

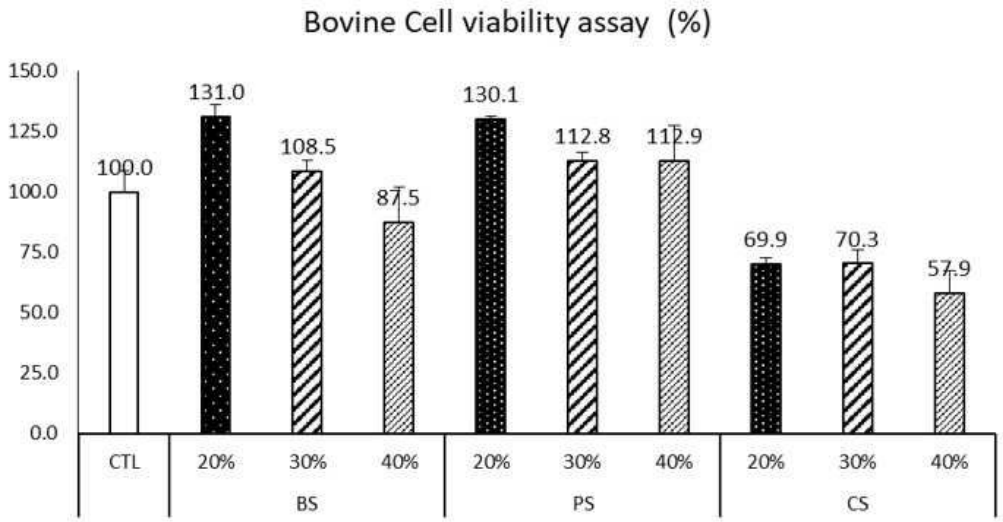
도면10



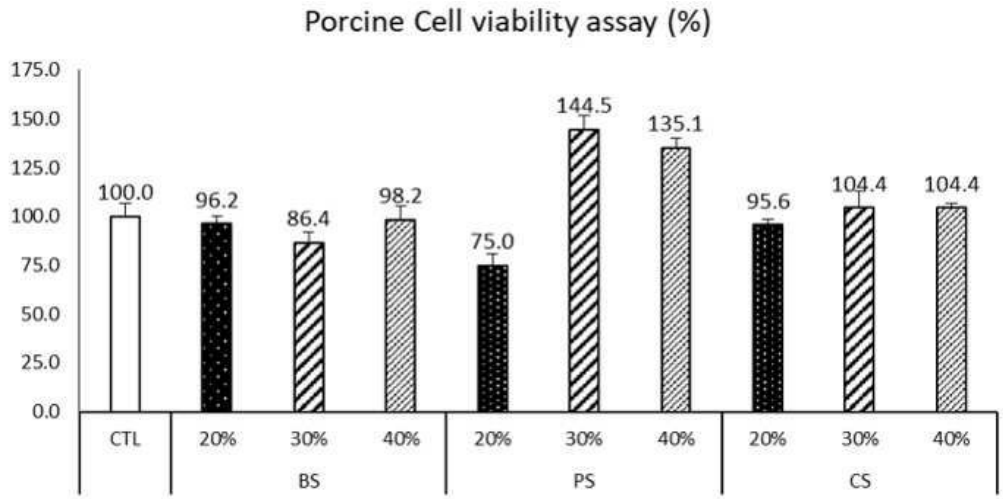
도면11


(a) 25%
Cell morphology
Mito Tracker
Hoechest
Merged
CTL
BP
BS
CP
CS
(b) 50%
Cell morphology
Mito Tracker
Hoechest
Merged
CTL
BP
BS
CP
CS

도면12



도면13



도면14

