



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0090560  
(43) 공개일자 2021년07월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 5/00 (2006.01) C12N 5/078 (2010.01)  
(52) CPC특허분류  
C12N 5/0018 (2013.01)  
C12N 5/0634 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2021-0002728  
(22) 출원일자 2021년01월08일  
심사청구일자 2021년01월08일  
(30) 우선권주장  
1020200003293 2020년01월09일 대한민국(KR)

(71) 출원인  
세종대학교산학협력단  
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)  
(72) 발명자  
박성권  
서울특별시 천호대로 1152 105동 302호  
라마니 시바수브 라마니안  
서울특별시 광진구 동일로46길 6-11, 2호  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
특허법인태동

전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 세포 배양용 소태아혈청 대체 소재

(57) 요약

본 발명은 세포 배양용 소태아혈청 대체 소재에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 세포 배양에 필요한 소태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS)의 대체 소재로써 이용 가능한 분유 분리 혈청(serum)에 관한 것이다. 본 발명의 분유 분리 혈청(serum)은 기존의 소태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS)만을 사용했을 때와 유사한 세포 성장 패턴을 보임을 통해 FBS의 부분적 대체가 가능하며, 효과적인 세포 배양용 FBS 대체 소재로서 이용할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

**김보성**

서울특별시 광진구 광나루로14길 8 1201호 (화양동)

**김우상**

경기도 의정부시 화릉로137번길 30, 102동 410호

**고든솔**

서울특별시 서대문구 북아연로 22길 56, 701호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                         |
|-------------|-------------------------|
| 과제고유번호      | 1415169786              |
| 과제번호        | 20012411                |
| 부처명         | 산업통상자원부                 |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국산업기술평가관리원             |
| 연구사업명       | 산업기술알케미스트프로젝트(R&D)      |
| 연구과제명       | 배양육 생산 기반 기술 구축 및 산업화   |
| 기 여 율       | 1/1                     |
| 과제수행기관명     | 서울대학교산학협력단              |
| 연구기간        | 2020.09.01 ~ 2021.04.30 |

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

분유를 물과 혼합한 후 정치하는 단계 (a);

상기 단계 (a)의 혼합 후, 자외선을 처리하고, 원심분리를 진행하는 단계 (b);

상기 단계 (b)의 원심분리 후, 상층의 크림층과 하층의 침전물을 제외한 중간층을 수득하는 단계 (c);

상기 단계 (c)에서 수득한 중간층에 소니케이션을 실시하고, 자외선을 처리하는 단계 (d);

상기 단계 (d)의 자외선 처리 후, 여과하는 단계 (e);를 포함하는 것을 특징으로 하는 소태아혈청의 대체가 가능한 분유 혈청의 제조방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 단계 (b) 또는 (d)의 자외선 처리는,

2~15분 동안 수행하는 것을 특징으로 하는 소태아혈청의 대체가 가능한 분유 혈청의 제조방법.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 단계 (b)의 원심분리는

9,000~16,000×g 조건에서 20~30분간 수행하는 것을 특징으로 하는 소태아혈청의 대체가 가능한 분유 혈청의 제조방법.

#### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 단계 (d)의 소니케이션은.

10~20분간 실시하는 것을 특징으로 하는 소태아혈청의 대체가 가능한 분유 혈청의 제조방법.

#### 청구항 5

제1항에 있어서,

상기 단계 (e)의 여과는,

0.20~0.30 $\mu$ m의 셀룰로오스 아세테이트 시린지(cellulose acetate syringe) 필터를 사용하여 수행하는 것을 특징으로 하는 소태아혈청의 대체가 가능한 분유 혈청의 제조방법.

#### 청구항 6

제1항으로부터 제조한 분유 혈청을 포함하는 것을 특징으로 하는 세포 배양용 배지.

#### 청구항 7

제6항에 있어서,

상기 세포 배양용 배지는,

소태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS)을 포함하고 있는 것을 특징으로 하는 세포 배양용 배지.

#### 청구항 8

제6항에 있어서,

상기 세포는,

소 근육세포, 돼지 근육세포, 닭 근육세포 중 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 세포 배양용 배지.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001] 본 발명은 세포 배양용 소태아혈청 대체 소재에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 세포 배양에 필요한 소태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS)의 대체 소재로써 이용 가능한 분유 분리 혈청(serum)에 관한 것이다.

#### 배경 기술

[0002] 기존 세포 실험에 주로 사용되는 소태아혈청은 성장 인자(growth factor), 면역글로불린(immuno-globulin), 단백질 등의 다양한 성분이 혼합되어 있고, 이를 통해 세포 실험 중 세포 성장, 생존 및 분리까지 영향을 미치게 된다. 또한, FBS는 소의 태아로부터 만들기에 자체적인 성분이 명확하게 정의되지는 않지만, 보유하고 있는 다양한 인자들로 인해 세포 실험에 없어서는 안 될 필수적인 물질이다.

[0003] 하지만, FBS를 사용하는 것으로부터 파생되는 여러가지 문제들이 있다. 먼저, FBS 생산을 위해서는 소의 태아로부터 혈액을 채취하여 혈청을 분리해야하므로, 이러한 과정에서 발생할 수 있는 소 태아에 대한 잠재적 고통 여부로 인한 윤리적 문제가 발생한다. 또한, FBS는 인공적인 화학물질의 조합이 아닌 실제 동물로부터 채취하여 제작하게 되므로 생산성의 한계가 있으며, 이러한 한계는 결국 수요에 대한 공급의 문제를 만들게 되어 구매 비용 상승을 초래하는 경제적 문제가 발생한다.

[0004] 따라서 FBS로 인한 상기와 같은 문제들을 해결할 수 있으면서 세포 배양에 효능이 있는 대체 소재의 개발이 필요한 실정이다.

### 선행기술문헌

#### 특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-19-896396호(등록일자: 2018.09.04)는, 동물세포 배양용 무혈청 배지에 관한 것으로, 소 태아혈청 성분을 대체하여 누에 피브로인을 포함하여 무혈청 상태에서 동물세포 배양이 이루어지는 것에 대해 기재되어 있다.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0006] 본 발명에서는 세포 배양에 필요한 소태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS)의 대체 소재로써 분유 분리 혈청(serum)을 전체 배지에 대하여 일부 혼합함으로써 기존의 FBS 사용을 감소시키면서도 FBS를 사용했을 때와 유사한 세포 성장 효능을 나타내는 대체소재를 제공하고자 한다.

### 과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 분유를 물과 혼합한 후 정치하는 단계 (a); 상기 단계 (a)의 혼합 후, 자외선을 처리하고, 원심분리를 진행하는 단계 (b); 상기 단계 (b)의 원심분리 후, 상층의 크림층과 하층의 침전물을 제외한 중간층을 수득하는 단계 (c); 상기 단계 (c)에서 수득한 중간층에 소니케이션을 실시하고, 자외선을 처리하는 단계 (d); 상기 단계 (d)의 자외선 처리 후, 여과하는 단계 (e);를 포함하는 것을 특징으로 하는 소태아혈청의 대체가 가능한 분유 혈청의 제조방법을 제공한다.

[0008] 한편, 본 발명에 있어서, 상기 단계 (b) 또는 (d)의 자외선 처리는, 바람직하게 2~15분 동안 수행하는 것일 수 있다.

[0009] 한편, 본 발명에 있어서, 상기 단계 (b)의 원심분리는, 바람직하게 9,000~16,000×g 조건에서 20~30분간 수행하는 것일 수 있다.

[0010] 한편, 본 발명에 있어서, 상기 단계 (d)의 소니케이션은, 바람직하게 10~20분간 실시하는 것일 수 있다.

[0011] 한편, 본 발명에 있어서, 상기 단계 (e)의 여과는, 바람직하게 0.20~0.30 $\mu$ m의 셀룰로오스 아세테이트 시린지(cellulose acetate syringe) 필터를 사용하여 수행하는 것일 수 있다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기에서 제조한 분유 혈청을 포함하는 것을 특징으로 하는 세포 배양용 배지를 제공한다.

[0013] 한편, 본 발명의 세포 배양용 배지에 있어서, 상기 세포 배양용 배지는, 소태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS)을 포함하고 있는 것일 수 있다.

[0014] 한편, 본 발명의 세포 배양용 배지에 있어서, 상기 세포는, 바람직하게 소 근육세포, 돼지 근육세포, 닭 근육세포 중 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.

### 발명의 효과

[0015] 본 발명은 소, 돼지, 닭 유래 세포 배양에서 분유 분리 혈청을 이용하여 기존의 소태아혈청만을 사용했을 때와 유사한 세포 성장 패턴을 보임을 통해 FBS의 부분적 대체가 가능하며, 효과적인 세포 배양용 FBS 대체 소재로서 이용할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 소태아혈청의 대체소재인 분유 분리 혈청의 사진이다.

도 2는 FBS와 본 발명의 분유 분리 혈청을 단독 처리 후(0%, 2.5%, 5%, 7.5%, 10%, 20%), 6시간 및 36시간 뒤에 측정된 TM3 세포 사진을 나타낸 것이다.

도 3은 FBS와 분유 분리 혈청 혼합 처리 0시간 후, 처리 농도에 따른 소 세포(borvine primary cell)의 수를 나타낸 사진이다.

도 4는 FBS와 분유 분리 혈청 혼합 처리 24시간 후, 처리 농도에 따른 소 세포의 수를 나타낸 사진이다.

도 5는 FBS와 분유 분리 혈청 혼합 처리 48시간 후, 처리 농도에 따른 소 세포의 수를 나타낸 사진이다.

도 6은 FBS와 분유 분리 혈청 혼합 처리 72시간 후, 처리 농도에 따른 소 세포의 수를 나타낸 사진이다.

도 7은 처리시간에 따른 FBS와 분유 분리 혈청 혼합 처리 농도별 소 세포의 수를 나타낸 그래프이다.

도 8은 FBS와 분유 분리 혈청 혼합 처리 0시간 후, 처리 농도에 따른 돼지 세포의 수를 나타낸 사진이다.

도 9는 FBS와 분유 분리 혈청 혼합 처리 24시간 후, 처리 농도에 따른 돼지 세포의 수를 나타낸 사진이다.

도 10은 FBS와 분유 분리 혈청 혼합 처리 48시간 후, 처리 농도에 따른 돼지 세포의 수를 나타낸 사진이다.

도 11은 FBS와 분유 분리 혈청 혼합 처리 72시간 후, 처리 농도에 따른 돼지 세포의 수를 나타낸 사진이다.

도 12는 처리시간에 따른 FBS와 분유 분리 혈청 혼합 처리 농도별 돼지 세포의 수를 나타낸 그래프이다.  
 도 13은 FBS와 분유 분리 혈청 혼합 처리 0시간 후, 처리 농도에 따른 닭 세포의 수를 나타낸 사진이다.  
 도 14는 FBS와 분유 분리 혈청 혼합 처리 24시간 후, 처리 농도에 따른 닭 세포의 수를 나타낸 사진이다.  
 도 15는 FBS와 분유 분리 혈청 혼합 처리 48시간 후, 처리 농도에 따른 닭 세포의 수를 나타낸 사진이다.  
 도 16은 FBS와 분유 분리 혈청 혼합 처리 72시간 후, 처리 농도에 따른 닭 세포의 수를 나타낸 사진이다.  
 도 17은 FBS와 분유 분리 혈청 혼합 처리 96시간 후, 처리 농도에 따른 닭 세포의 수를 나타낸 사진이다.  
 도 18은 처리시간에 따른 FBS와 분유 분리 혈청 혼합 처리 농도별 닭 세포의 수를 나타낸 그래프이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 기존 세포 실험에 주로 사용되는 소태아혈청은 성장 인자, 면역글로불린, 단백질 등의 다양한 성분이 혼합되어 있고, 이를 통해 세포 실험 중 세포 성장, 생존 및 분리까지 영향을 미치게 되므로 필수적인 물질이다. 하지만, FBS는 소의 태아로부터 만들기 때문에 생산성의 한계로 인해 고가로 거래되고 있으며, 소 태아의 이용으로부터 윤리적 문제를 야기하게 된다. 따라서 상기와 같은 FBS로 인한 상기와 같은 문제들을 해결하고자 본 발명에서는 분유 분리 혈청을 이용해 FBS를 대체하고자 하였다.
- [0018] 이에 본 발명은 본 발명은 분유를 물과 혼합한 후 정치하는 단계 (a); 상기 단계 (a)의 혼합 후, 자외선을 처리하고, 원심분리를 진행하는 단계 (b); 상기 단계 (b)의 원심분리 후, 상층의 크림층과 하층의 침전물을 제외한 중간층을 수득하는 단계 (c); 상기 단계 (c)에서 수득한 중간층에 소니케이션을 실시하고, 자외선을 처리하는 단계 (d); 상기 단계 (d)의 자외선 처리 후, 여과하는 단계 (e);를 포함하는 것을 특징으로 하는 소태아혈청의 대체가 가능한 분유 혈청의 제조방법을 제공한다.
- [0019] 분유의 제조시 사용되는 우유는 포유류의 분만 후 분비되는 유즙으로써, 시판되는 분유들은 유아의 성장과 발달을 돕고 면역능력 향상을 위해 DHA, 면역글로불린(immunoglobulin), 알파-락토글로불린( $\alpha$ -lactoglobulin), 무기질, 단백질 등의 다양한 성분들이 첨가된다. 일부 분유 제품에서는 유아 성장을 돕기 위해 트랜스포밍 그로스 팩터(Transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ), 인슐린-유사 성장인자(Insulin-like growth factor, IGF)와 같은 성장인자를 배합하기도 한다. 이러한 사실에 근거하여 본 발명에서는 분유에 존재하는 성장에 관여하는 특정 성분을 분리함으로써 FBS 대체 소재로써 사용하고자 하였다.
- [0020] 한편, 본 발명에 있어서, 상기 단계 (a)의 분유는, 바람직하게 물 10 중량부에 대해 10~20 중량부의 비율로 혼합하는 것이 좋으며, 더 바람직하게는 물 10 중량부에 대해 13~15 중량부의 비율로 혼합하는 것이 좋다.
- [0021] 한편, 본 발명에 있어서, 상기 단계 (a)의 정치는, 우유 분말이 용해될 수 있게 하는 목적으로 수행하며, 본 발명에서는 용해를 위해 교반기(stirrer)를 사용하였다. 바람직하게 30~38℃의 워터배스에서 5~15분간 정치하는 것이 좋으며, 더 바람직하게는 37℃에서 10~15분간 정치하여 우유 분말이 최대한 용해되도록 하는 것이 좋다. 상기 온도 범위 초과일 경우 우유 피막 형성이 될 우려가 있고, 상기 온도 범위 미만일 경우 용해 속도가 느려질 수 있어 바람직하지 않다.
- [0022] 한편, 본 발명에 있어서, 상기 단계 (b) 또는 (d)의 자외선 처리는, 병원성 세균과 곰팡이를 제거하는 목적으로 수행하며, 바람직하게 2~15분 동안 수행하는 것이 좋다. 상기 시간 범위 미만일 경우 미생물 수 감소가 미미할 수 있고, 상기 시간 범위 초과일 경우, 우유 자체의 관능이 훼손되어 바람직하지 않다. 또한, 최종적으로 수득되는 분유 분리 혈청 내 FBS 대체 성분들의 구조적 변화를 일으킬 수 있어 바람직하지 않다.
- [0023] 한편, 본 발명에 있어서, 상기 단계 (b)의 원심분리는, 미생물, 곰팡이(특히, 포자형성균) 등을 제거하는 목적으로 수행하며, 바람직하게 9,000~16,000×g 조건에서 20~30분간 수행하는 것이 좋다. 상기 원심분리 속도 범위 초과일 경우, 원심력이 너무 강하여, 최종적으로 수득되는 분유 분리 혈청 내 존재하게 될 FBS 대체 물질들의 분리가 어려워 바람직하지 않다. 또한, 상기 원심분리 속도 범위 미만일 경우, 균분리가 미미할 수 있다.
- [0024] 한편, 본 발명에 있어서, 상기 단계 (d)의 소니케이션은, 원심분리 후의 펠렛(pellet)을 용해시키기 위한 목적으로 수행하며, 바람직하게 10~20분간 실시하는 것이 좋다. 상기 소니케이션 시간 범위 미만일 경우 소니케이션의 효과가 없을 수 있고, 상기 소니케이션 시간 범위 초과일 경우 오히려 열이 발생되어 단백질 손상이 우려될 수 있어 바람직하지 않다. 특히나, 최종적으로 수득되는 분유 분리 혈청 내 존재하게 될 FBS 대체 물질들의 손상 가능성이 있어 바람직하지 않은 것이다.

- [0025] 한편, 본 발명에 있어서, 상기 단계 (e)의 여과는, 박테리아를 분리하기 위한 목적으로 수행하며, 바람직하게 0.20~0.30 $\mu$ m의 셀룰로오스 아세테이트 시린지(cellulose acetate syringe) 필터를 사용하여 수행하는 것이 좋다. 상기 필터 크기 범위 초과하거나 미만일 경우, 최종적으로 수득되는 분유 분리 혈청 내 존재하게 될 FBS 대체 물질을 선택적으로 여과하는 기능이 발휘되지 않는다.
- [0026] 또한, 본 발명은 상기에서 제조한 분유 혈청을 포함하는 것을 특징으로 하는 세포 배양용 배지를 제공한다.
- [0027] 한편, 본 발명의 세포 배양용 배지에 있어서, 상기 세포 배양용 배지는, 바람직하게 소태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS)을 포함하고 있는 것일 수 있다.
- [0028] 한편, 본 발명의 세포 배양용 배지에 있어서, 상기 세포는 일 예로 소 근육세포, 돼지 근육세포, 닭 근육세포 중 선택되는 어느 하나인 것일 수 있다. 이때, 세포 배양에 사용하는 FBS를 완전히 대체하여 사용할 수 있으며, 특히 닭 근육세포를 사용할 때 대체효과가 가장 뛰어난 것으로 나타났다.
- [0029] 한편, 본 발명에서 적절한 세포 배양 배지로는 일예로, DMEM 배지, HAM 배지, IMDM 배지 등이 있으며, 본 발명에서는 DMEM 배지를 사용하였다. 또한, 상기 세포 배양 배지는 추가적으로 항생제를 포함할 수 있으며, 본 발명에서는 항생제 항진균(antibiotic antimycotic), 클로람페니콜(chloramphenicol), 카나마이신(kanamycin), 마이코플라즈마 리무벌 에이전트(mycoplasma removal agent)를 포함하였으나, 이에 한정되지 않으며 세포의 종류 및 특성에 따라 당업자에 의하여 용이하게 조절할 수 있다.
- [0030] 한편, 본 발명에서 하기 실험에 의하면, 본 발명의 분유 분리 혈청(seum)은 단독처리 7.5% 수준에서 10% FBS와 유사한 세포 성장능을 나타냈다. 또한, FBS와 분유 분리 혈청을 혼합 처리시, 소 근육세포, 돼지 근육세포에서 FBS를 본 발명 분유 분리 혈청 75%로 대체하여도 FBS 단독 사용시와 비슷한 세포 성장능을 나타내는 것을 확인하였고, 닭 배아 근육세포에서는 FBS를 완전히 대체하여도 비슷한 세포 성장능을 나타내는 것을 확인하였다. 이를 통해 본 발명의 분유 분리 혈청을 이용함으로써 FBS의 대체가 가능하여 효과적인 세포 배양용 FBS 대체 소재로서의 이용 가능성을 확인할 수 있었다.
- [0031] 이러한 FBS의 대체는 세계적으로 진행되고 있는 동물 세포를 이용한 배양육 연구의 경쟁력 강화를 이룰 수 있다. 세포를 배양하여 실제 사람이 섭취할 수 있는 고기를 만드는 것을 목표로 하는 배양육 연구는 시장성을 갖추는 데 있어서 생산비용의 절감이 절실하다. 따라서, FBS 대체 소재로써 분유 분리 혈청의 이용은 고가로 거래되는 FBS의 대체 소재로 작용함과 동시에 배양육 생산의 비용 절감을 이룩하여 미래 식품산업의 가능성을 제시할 수 있다.
- [0032] 이하, 본 발명의 내용을 하기 실시예 및 실험예를 통해 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.
- [0034] **[실시예 : 분유 분리 혈청의 제조 및 이의 처리에 따른 세포 배양 실험]**
- [0035] 본 실시예에서는 소태아혈청의 대체소재로써 분유분리 혈청을 제조하고, FBS 및 분유 분리 혈청 처리에 따른 세포 배양 실험을 비교수행하였다.
- [0037] **1) 분유의 분리**
- [0038] FBS의 대체소재로써 시판되고 있는 분유('엄마로 태어나다 아이엠마더 1', 남양유업사, 대한민국)를 소재로 실험에 사용하였다.
- [0039] 분유에서 유효성분을 분리하는 방법은 다음과 같다. 우선 14 g의 분말을 10 mL의 물과 섞고 37℃의 워터배스에 10분간 정치하였다. 그 후, 자외선을 10분간 방사한 후, 원심분리를 진행하였다. 원심분리를 16,000 x g 조건에서 25분간 진행하고, 최상층의 크림층과 최하층의 부유성분들을 제외한 중간의 혈청층을 조심히 획득하였다. 획득한 혈청층은 다시 소니케이션을 15분간 실시하고, 자외선 처리 10분 진행 후, 최종적으로 0.22  $\mu$ m의 셀룰로오스 아세테이트 시린지(cellulose acetate syringe) 필터로 걸러낸 후 사용하였다. 분유 분리 혈청의 사진을 도 1에 나타냈다.
- [0041] **2) FBS와 분유 분리 혈청의 단독 처리에 따른 세포 배양 실험**

[0042] 마우스의 정소에서 기반한 TM3 세포를 페트리디쉬(petri dish)에서 24시간 스케일-업(scale-up)한 후, 6 well plate로  $0.5 \times 10^6$ 의 수로 균일하게 분주하였다. 이때, 사용한 성장배지의 조성은 DMEM(high glucose) 66%, FBS 30%, 항생제 4%(각각 항생제 항진균(antibiotic antimycotic) 1%, 클로람페니콜(chloramphenicol) 1%, 카나마이신(kanamycin) 1%, 마이코플라즈마 리무벌 에이전트(mycoplasma removal agent) 1%로 구성)이다.

[0043] 6 well plate로의 분주 후, 다시 동일한 배지 조성으로 12시간 동안 배양하여 부착을 유도하였다. 12시간 후 DPBS 용액을 이용하여 세포를 세척한 후, FBS와 분유 분리 혈청을 단독으로 처리하였다. 처리 비율은 FBS와 분유 분리 혈청을 각각 0%, 2.5%, 5%, 7.5%, 10%, 20%로 처리하였다. 또한, 어떠한 혈청 성분도 들어가지 않은 0%(serum free)를 지정하여 대조구로 삼아 비교하였다. 세포의 관찰은 처리 후 6시간, 36시간에 관찰하였다.

[0044] 실험 결과, 도 2와 같이 처리 후 6시간 후의 사진에서는 FBS나 분유 분리 혈청의 단독 처리에 상관없이 뚜렷한 차이가 나타나지 않았다. 하지만, 처리후 36시간 후의 사진에서는 FBS 처리한 경우, 생장이 원활히 일어나 세포 밀도의 차이가 뚜렷이 나타나는 것을 볼 수 있었다. 다만, 분유 분리 혈청의 단독처리 7.5%에서 세포 증식의 양상이 기존의 FBS 10% 처리하였을 때와 유사한 성장능을 나타내서 FBS를 대체할 수 있는 소재로서의 가능성을 확인할 수 있었다.

#### [0046] [실험예 1: FBS와 분유 분리 혈청 혼합물의 세포 배양(primary cell culture) 실험]

[0047] 본 실험예에서는 FBS와 분유 분리 혈청을 혼합 사용하여 세포 배양 실험을 수행하였다.

#### [0049] 1) FBS와 분유 분리 혈청 혼합물의 소 근육세포 배양 실험

[0050] 실험에 사용한 분유 분리 혈청은 TM3와 같은 방법으로 분리하여 준비하였다. 소(한우) 근육세포 배양은 우선적으로 스케일-업(scale-up)을 위해 t175 플라스크(flask)를 이용해 배양하였다. 스케일-업을 위한 배양을 위해 배지 조성은 DMEM F-12 86%, FBS 10%, 항생제 4%(각각 항생제 항진균(antibiotic antimycotic) 1%, 클로람페니콜(chloramphenicol) 1%, 카나마이신(kanamycin) 1%, 마이코플라즈마 리무벌 에이전트(mycoplasma removal agent) 1%로 구성)로 구성하였고, 배양이 끝난 후의 세포는 EDTA를 통해 탈착시켜 세포 수를 세어 6 well plate로  $0.5 \times 10^6$ 의 수로 균일하게 분주하였다.

[0051] 분주 후, 다시 동일한 배지 조성으로 12시간 동안 배양하여 부착을 유도하였다. 12시간 후, DPBS 용액을 이용하여 세포를 세척한 후 FBS와 분유 분리 혈청을 혼합하여 처리하였다. 처리 시의 배지 조성은 DMEM F-12 86%, FBS와 분유 분리 혈청 혼합분 10%, 항생제 4%(각각 항생제 항진균 1%, 클로람페니콜 1%, 카나마이신 1%, 마이코플라즈마 리무벌 에이전트 1%로 구성)이었다. FBS와 분유 분리 혈청(milk로 표기) 혼합 농도는 총 10%로써, 10% FBS와 0% 분유 분리 혈청, 7.5% FBS와 2.5% 분유 분리 혈청, 5% FBS와 5% 분유 분리 혈청, 2.5% FBS와 7.5% 분유 분리 혈청, 0% FBS와 10% 분유 분리 혈청으로 구성되어 있고 추가적으로 음성 대조군(negative control)으로써 DMEM과 항생제만을 함유한 채로 처리하였다.

[0052] 세포의 관찰은 현미경을 이용하여 진행하였고, FBS와 분유 분리 혈청 혼합 처리 후를 기점으로 0시간, 24시간, 48시간, 72시간에 각각 세포의 성장을 관찰하였다. 도 3 내지 도 6은 각 관찰 시간별의 세포 사진을 나타낸 것이며, 이를 기반으로 image J 소프트웨어를 이용하여 측정한 개별 세포의 수에 대한 그래프를 도 7에 나타냈고, 하기 표 1에 SPSS 통계 프로그램을 통한 유의적 차이를 나타냈다.

표 1

[0053] 처리 시간에 따른 소 근육세포의 수

| AVG                  | 0hr                 | 24hr                   | 48hr               | 72hr                 |
|----------------------|---------------------|------------------------|--------------------|----------------------|
| DMEM                 | $198 \pm 77.2^a$    | $213 \pm 41.8^a$       | $197.5 \pm 25.0^a$ | $164.25 \pm 22.0^a$  |
| 0% Milk / 10%FBS     | $101.5 \pm 26.0^b$  | $189.5 \pm 63.7^b$     | $238 \pm 13.9^b$   | $301.75 \pm 31.2^a$  |
| 2.5% Milk / 7.5% FBS | $116.25 \pm 33.8^b$ | $209 \pm 32.6^b$       | $311 \pm 32.6^b$   | $349 \pm 60.6^b$     |
| 5% Milk / 5% FBS     | $123.5 \pm 34.8^b$  | $193.25 \pm 92.1^{ab}$ | $223 \pm 77.2^b$   | $280.25 \pm 105.6^a$ |

|                        |                          |                           |                          |                          |
|------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 7.5% Milk<br>/2.5% FBS | 65.5±17.1 <sup>b</sup>   | 74.5±27.3 <sup>c</sup>    | 114.25±38.1 <sup>c</sup> | 157.25±69.6 <sup>b</sup> |
| 10% Milk<br>/0% FBS    | 118.75±19.2 <sup>b</sup> | 292.25±66.8 <sup>ab</sup> | 220.75±14.3 <sup>b</sup> | 104±29.9 <sup>b</sup>    |

[0054] 처리 후, 각 시간당 대조군과 실험군간의 비교 ( $p < 0.05$ )

[0056] 그 결과, 분유 분리 혈청을 FBS와 혼합하여 사용하여도 소 근육세포 성장능이 비슷하게 나타나는 것을 확인할 수 있었고, 특히 FBS를 본 발명의 분유 분리 혈청 75% 대체할 경우(7.5% 분유 분리 혈청(milk)+2.5% FBS)에도 FBS 단독 사용(10% FBS)과 비슷한 성장능을 나타내는 것을 확인하였다. 이러한 결과를 통해 소 근육세포 배양시 분유 분리 혈청을 이용한 FBS의 대체가 가능하며, 분유 분리 혈청이 효과적인 대체 소재로써의 이용가능성을 확인할 수 있었다.

## [0058] 2) FBS와 분유 분리 혈청(serum) 혼합물의 돼지 근육세포 배양 실험

[0059] 실험에 사용한 분유 분리 혈청은 TM3와 같은 방법으로 분리하여 준비하였다. 돼지 근육세포 배양은 우선적으로 스케일-업을 위해 t175 플라스크를 이용해 배양하였다. 스케일-업을 위한 배양을 위해 배지 조성은 DMEM F-12 86%, FBS 10%, 항생제 4%(각각 항생제 항진균 1%, 클로람페니콜 1%, 카나마이신 1%, 마이코플라즈마 리무벌 에이전트 1%로 구성)로 구성하였고, 배양이 끝난 후의 세포는 EDTA를 통해 탈착시켜 세포 수를 세어 6 well plate로  $0.5 \times 10^6$ 의 수로 균일하게 분주하였다.

[0060] 분주 후, 다시 동일한 배지 조성으로 12시간 동안 배양하여 부착을 유도하였다. 12시간 후, DPBS 용액을 이용하여 세포를 세척한 후 FBS와 분유 분리 혈청을 혼합하여 처리하였다. 처리 시의 배지 조성은 DMEM F-12 86%, FBS와 분유 분리 혈청 혼합분 10%, 항생제 4%(각각 항생제 항진균 1%, 클로람페니콜 1%, 카나마이신 1%, 마이코플라즈마 리무벌 에이전트 1%로 구성)이었다. FBS와 분유 분리 혈청 혼합 농도는 총 10%로써, 10% FBS와 0% 분유 분리 혈청, 7.5% FBS와 2.5% 분유 분리 혈청, 5% FBS와 5% 분유 분리 혈청, 2.5% FBS와 7.5% 분유 분리 혈청, 0% FBS와 10% 분유 분리 혈청으로 구성되어 있고 추가적으로 음성 대조군으로써 DMEM과 항생제만을 함유한 채로 처리하였다.

[0061] 세포의 관찰은 현미경을 이용하여 진행하였고, FBS와 분유 분리 혈청 혼합 처리 후를 기점으로 0시간, 24시간, 48시간, 72시간에 각각 세포의 성장을 관찰하였다. 도 8 내지 도 11은 각 관찰 시간별의 세포 사진을 나타낸 것이며, 이를 기반으로 image J 소프트웨어를 이용하여 측정한 개별 세포의 수에 대한 그래프를 도 12에 나타냈고, 하기 표 2에 SPSS 통계 프로그램을 통한 유의적 차이를 나타냈다.

표 2

[0062] 처리 시간에 따른 돼지 근육세포의 수

| AVG                    | 0hr                      | 24hr                     | 48hr                     | 72hr                     |
|------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| DMEM                   | 236.3±9.1 <sup>c</sup>   | 283.5±27.1 <sup>c</sup>  | 190±15.8 <sup>c</sup>    | 128.5±16.8 <sup>c</sup>  |
| 0% Milk/<br>10%FBS     | 267±13.1 <sup>bc</sup>   | 320.5±9.3 <sup>c</sup>   | 399±32.5 <sup>b</sup>    | 409.75±24.0 <sup>b</sup> |
| 2.5% Milk<br>/7.5% FBS | 302±38.0 <sup>ab</sup>   | 333±34.9 <sup>c</sup>    | 380.5±18.0 <sup>b</sup>  | 420.75±27.2 <sup>a</sup> |
| 5% Milk<br>/5% FBS     | 322.7±27.5 <sup>a</sup>  | 453.7±27.0 <sup>a</sup>  | 464±40.5 <sup>a</sup>    | 442.5±83.1 <sup>a</sup>  |
| 7.5% Milk<br>/2.5% FBS | 310±16.1 <sup>ab</sup>   | 406.75±44.5 <sup>b</sup> | 423±29.3 <sup>a</sup>    | 437.5±37.9 <sup>a</sup>  |
| 10% Milk<br>/0% FBS    | 294.7±44.7 <sup>ab</sup> | 417.5±40.1 <sup>ab</sup> | 438.25±34.0 <sup>a</sup> | 305.5±36.3 <sup>a</sup>  |

[0063] 처리 후, 각 시간당 대조군과 실험군간의 비교 ( $p < 0.05$ )

[0065] 그 결과, 분유 분리 혈청을 FBS와 혼합하여 사용하여도 돼지 근육세포 성장능이 비슷하게 나타나는 것을 확인할 수 있었고, 특히 FBS를 본 발명의 분유 분리 혈청 75% 대체할 경우(7.5% 분유 분리 혈청(milk)+2.5% FBS)에도 FBS 단독 사용(10% FBS)과 비슷한 성장능을 나타내는 것을 확인하였다. 이러한 결과를 통해 돼지 근육세포 배양 시 분유 분리 혈청을 이용한 FBS의 대체가 가능하며, 분유 분리 혈청이 효과적인 대체 소재로써의 이용가능성을 확인할 수 있었다.

### [0067] 3) FBS와 분유 분리 혈청(serum) 혼합물의 닭 배아 근육세포 배양 실험

[0068] 실험에 사용한 분유 분리 혈청은 TM3와 같은 방법으로 분리하여 준비하였다. 닭 배아 근육세포 배양은 우선적으로 스케일-업을 위해 t175 플라스크를 이용해 배양하였다. 스케일-업을 위한 배양을 위해 배지 조성은 DMEM F-12 86%, FBS 10%, 항생제 4%(각각 항생제 항진균 1%, 클로람페니콜 1%, 카나마이신 1%, 마이코플라스마 리무벌 에이전트 1%로 구성)로 구성하였고, 배양이 끝난 후의 세포는 EDTA를 통해 탈착시켜 세포 수를 세어 6 well plate로  $0.5 \times 10^6$ 의 수로 균일하게 분주하였다.

[0069] 분주 후, 다시 동일한 배지 조성으로 12시간 동안 배양하여 부착을 유도하였다. 12시간 후, DPBS 용액을 이용하여 세포를 세척한 후 FBS와 분유 분리 혈청을 혼합하여 처리하였다. 처리 시의 배지 조성은 DMEM F-12 86%, FBS와 분유 분리 혈청 혼합분 10%, 항생제 4%(각각 항생제 항진균 1%, 클로람페니콜 1%, 카나마이신 1%, 마이코플라스마 리무벌 에이전트 1%로 구성)이었다. FBS와 분유 분리 혈청 혼합 농도는 총 10%로써, 10% FBS, 5% 분유 분리 혈청, 10% 분유 분리 혈청으로 구성되어 있고 추가적으로 음성 대조군으로써 DMEM과 항생제만을 함유한 채로 처리하였다.

[0070] 세포의 관찰은 현미경을 이용하여 진행하였고, FBS와 분유 분리 혈청 혼합 처리 후를 기점으로 0시간, 24시간, 48시간, 72시간, 96시간에 각각 세포의 성장을 관찰하였다. 도 13 내지 도 17은 각 관찰 시간별의 세포 사진을 나타낸 것이며, 이를 기반으로 image J 소프트웨어를 이용하여 측정한 개별 세포의 수에 대한 그래프를 도 18에 나타냈고, 하기 표 3에 SPSS 통계 프로그램을 통한 유의적 차이를 나타냈다.

**표 3**

[0071] 처리 시간에 따른 닭 배아 근육세포의 수

|          | 0hr | 24hr              | 48hr              | 72hr              | 96hr              |
|----------|-----|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| DMEM     | 39  | $20.5 \pm 6.02^b$ | $14 \pm 3.67^c$   | $7.5 \pm 1.12^c$  | $5^d$             |
| 10%FBS   | 61  | $47.3 \pm 4.15^a$ | $56.3 \pm 4.38^a$ | $76 \pm 5.10^a$   | $82.3 \pm 4.32^b$ |
| 5% Milk  | 49  | $27.0 \pm 3.24^b$ | $32.8 \pm 2.77^b$ | $41.0 \pm 4.36^b$ | $50.3 \pm 4.02^c$ |
| 10% Milk | 51  | $40.0 \pm 6.78^a$ | $52.5 \pm 5.41^a$ | $69.8 \pm 7.82^a$ | $93.5 \pm 7.70^a$ |

[0072] 처리 후, 각 시간당 대조군과 실험군간의 비교

[0074] 그 결과, 분유 분리 혈청을 FBS 대신 사용하여도 닭 배아 근육세포 성장능이 비슷하게 나타나는 것을 확인할 수 있었고, 특히 10% FBS를 같은 양의 본 발명 분유 분리 혈청으로 완전 대체할 경우(10% 분유 분리 혈청(milk))에도 비슷한 성장능을 나타내는 것을 확인하였다. 이러한 결과를 통해 닭 배아 근육세포 배양시 분유 분리 혈청을 이용한 FBS의 대체가 가능하며, 분유 분리 혈청이 효과적인 대체 소재로써의 이용가능성을 확인할 수 있었다.

도면

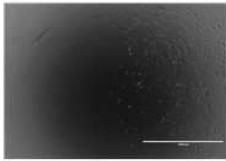
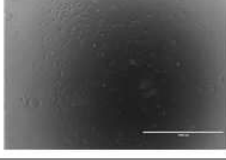
도면1



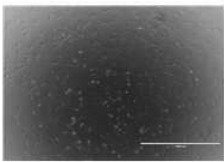
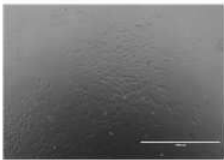
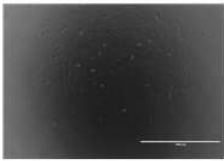
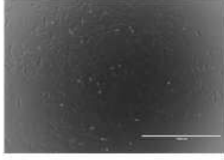
도면2

|      | FBS |      | 분유  |      |
|------|-----|------|-----|------|
|      | 6시간 | 36시간 | 6시간 | 36시간 |
| 0%   |     |      |     |      |
| 2.5% |     |      |     |      |
| 5%   |     |      |     |      |
| 7.5% |     |      |     |      |
| 10%  |     |      |     |      |
| 20%  |     |      |     |      |

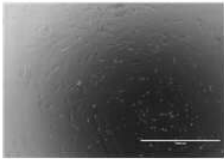
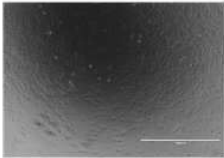
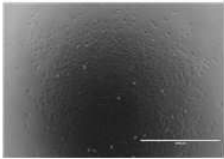
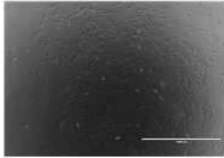
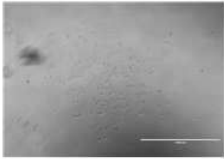
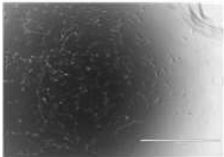
도면3

| 처리                   | 세포사진                                                                                |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| DMEM                 |    |
| 0% Milk / 10%FBS     |    |
| 2.5% Milk / 7.5% FBS |    |
| 5% Milk / 5% FBS     |   |
| 7.5% Milk / 2.5% FBS |  |
| 10% Milk / 0% FBS    |  |

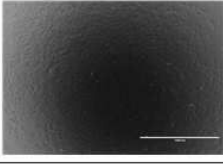
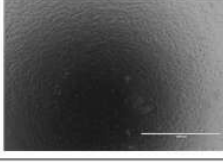
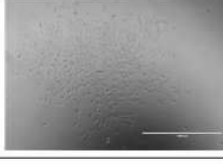
도면4

| 처리                   | 세포사진                                                                                |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| DMEM                 |    |
| 0% Milk / 10%FBS     |    |
| 2.5% Milk / 7.5% FBS |    |
| 5% Milk / 5% FBS     |   |
| 7.5% Milk / 2.5% FBS |  |
| 10% Milk / 0% FBS    |  |

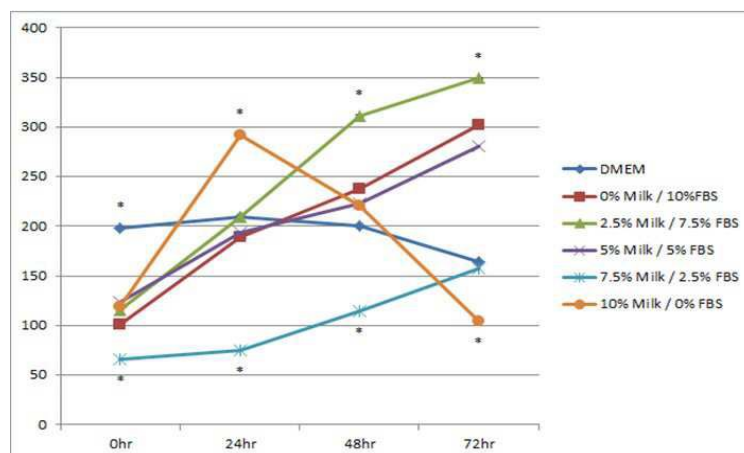
도면5

| 처리                   | 세포사진                                                                                |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| DMEM                 |    |
| 0% Milk / 10%FBS     |    |
| 2.5% Milk / 7.5% FBS |    |
| 5% Milk / 5% FBS     |   |
| 7.5% Milk / 2.5% FBS |  |
| 10% Milk / 0% FBS    |  |

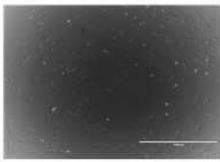
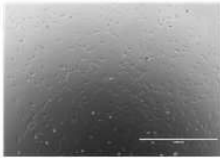
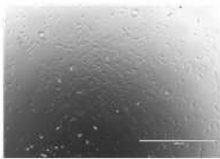
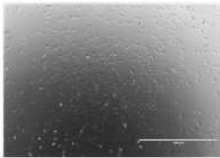
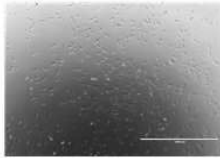
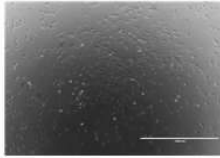
도면6

| 처리                   | 세포사진                                                                                |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| DMEM                 |    |
| 0% Milk / 10%FBS     |    |
| 2.5% Milk / 7.5% FBS |    |
| 5% Milk / 5% FBS     |   |
| 7.5% Milk / 2.5% FBS |  |
| 10% Milk / 0% FBS    |  |

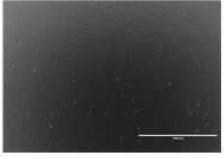
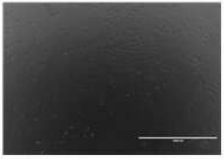
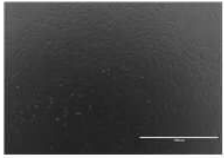
도면7



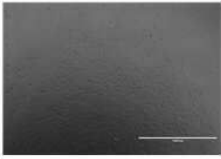
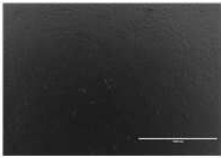
도면8

| 처리                   | 세포사진                                                                                |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| DMEM                 |    |
| 0% Milk / 10%FBS     |    |
| 2.5% Milk / 7.5% FBS |    |
| 5% Milk / 5% FBS     |   |
| 7.5% Milk / 2.5% FBS |  |
| 10% Milk / 0% FBS    |  |

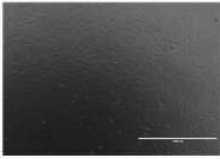
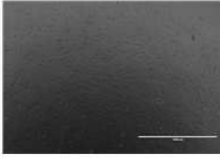
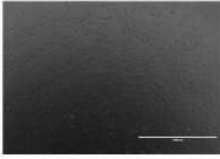
도면9

| 처리                   | 세포사진                                                                                |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| DMEM                 |    |
| 0% Milk / 10%FBS     |    |
| 2.5% Milk / 7.5% FBS |    |
| 5% Milk / 5% FBS     |   |
| 7.5% Milk / 2.5% FBS |  |
| 10% Milk / 0% FBS    |  |

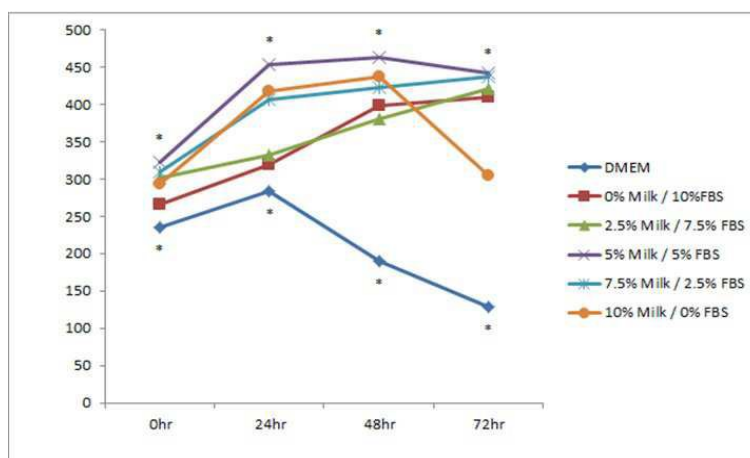
도면10

| 처리                   | 세포사진                                                                                |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| DMEM                 |    |
| 0% Milk / 10%FBS     |    |
| 2.5% Milk / 7.5% FBS |    |
| 5% Milk / 5% FBS     |   |
| 7.5% Milk / 2.5% FBS |  |
| 10% Milk / 0% FBS    |  |

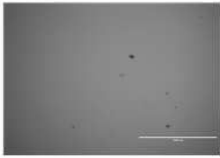
도면11

| 처리                   | 세포사진                                                                                |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| DMEM                 |    |
| 0% Milk / 10%FBS     |    |
| 2.5% Milk / 7.5% FBS |    |
| 5% Milk / 5% FBS     |   |
| 7.5% Milk / 2.5% FBS |  |
| 10% Milk / 0% FBS    |  |

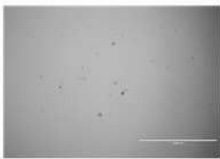
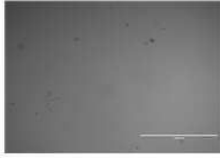
도면12



도면13

| 처리                | 세포사진                                                                               |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| DMEM              |   |
| 0% Milk / 10%FBS  |   |
| 5% Milk / 0% FBS  |   |
| 10% Milk / 0% FBS |  |

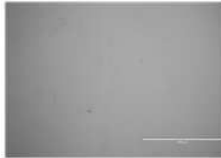
도면14

| 처리                | 세포사진                                                                                |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| DMEM              |  |
| 0% Milk / 10%FBS  |  |
| 5% Milk / 0% FBS  |  |
| 10% Milk / 0% FBS |  |

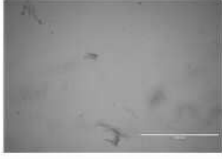
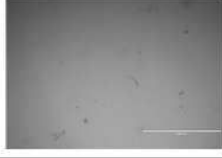
도면15

| 처리                | 세포사진                                                                               |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| DMEM              |   |
| 0% Milk / 10%FBS  |   |
| 5% Milk / 0% FBS  |   |
| 10% Milk / 0% FBS |  |

도면16

| 처리                | 세포사진                                                                                |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| DMEM              |  |
| 0% Milk / 10%FBS  |  |
| 5% Milk / 0% FBS  |  |
| 10% Milk / 0% FBS |  |

도면17

| 처리                | 세포사진                                                                               |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| DMEM              |   |
| 0% Milk / 10%FBS  |   |
| 5% Milk / 0% FBS  |   |
| 10% Milk / 0% FBS |  |

도면18

