

명세서

발명의 명칭: 식물성 단백질을 포함하는 다공성 세포 지지체 및 이를 이용하여 제조된 배양육

기술분야

- [1] 식물성 단백질을 포함하는 다공성 세포 지지체 및 이를 이용하여 제조된 배양육에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 2050년이 되면 전 세계 인구는 90억 명에 이르고, 인류의 육류 소비량 역시 465백만톤에 달할 것으로 추정된다. 이에 국제연합식량농업기구(FAO)는 증가하는 육류 수요를 맞추기 위해 매년 2억톤의 추가 생산이 필요함을 발표한 바있다. 이러한 미래의 육류 부족 문제를 해결하기 위한 방안으로 최근 '배양육(In Vitro Meat)'이 주목받고 있다. '배양육'이란 살아있는 동물의 세포를 채취한 뒤 세포 공학 기술로 증식하여 얻게 되는 식용 고기를 의미하며, 가축을 사육하는 과정을 거치지 않고 고기를 얻는 세포 농업(cellular agriculture)의 한 분야를 의미한다.
- [3] 배양육의 개발로 인하여 가축 사육과 도축 과정에서 발생하는 각종 환경 오염과 윤리적인 문제를 일정 부분 해결할 수 있다는 인식이 확산되고 있으며, 가축 사육이 온실 가스 배출의 주요 요인으로 꼽혀왔으며, 가축 사육이 줄어들 경우 농경지 확대, 토양 침식 감소, 수질오염 방지 등의 효과를 기대할 수 있다.
- [4] 또한, 배양육은 열악한 축사 환경 및 도축과 관련한 동물 복지 측면에서도 이점이 있으며, 광우병, 구제역과 같은 가축 전염병의 발병 위험을 배제할 수 있고, 기술 수준에 따라 소고기뿐만 아니라 돼지고기, 닭고기, 어류 배양육 생산이 가능하다. 따라서, 배양육을 대규모로 생산하는 것이 자원을 절감하고 축산업이 남기는 환경적 영향을 줄일 수 있는 효과적인 방법이 될 것으로 예상되고 있다.
- [5] 한편, 배양육의 제조 비용은 2013년 초기 개발 당시에 햄버거 패티 100 g 1개를 만드는 데 무려 32만 5천 달러가 필요하였으며, 2017년 기준 1,986 달러/100 g로 크게 감소하기는 하였으나 여전히 매우 높은 수준이다. 또한, 현재 생산된 배양육은 생산 기술의 한계로 기존 육류보다 상대적으로 맛이 떨어진다는 평을 받고 있다는 단점이 있다. 스테이크 같은 육류 본연의 맛이 중요한 식재료로는 쓰이지 못하고 햄버거 패티용 재료로 선보이고 있기 때문에, 기존 육류와 맛의 차이를 없애는 위하여 근육질, 기름, 뼈 등을 배양육과 혼합하면서 실제 고기와 같은 맛을 내기 위한 연구도 활발히 진행 중이다. 뿐만 아니라, 배양육 제조를 위한 세포 배양 배지에 말이나 소의 태아 혈청이 필요하여 배양육 제조가 증가할수록 가축 도축 또한 증가하는 모순이 발생하게 된다.
- [6] 따라서, 배양육 제조 방법에 있어서 높은 비용 문제를 해결하면서도 대량

생산이 가능하고 기존 육류와 비슷한 맛을 내기 위한 기술적인 연구가 요구되고 있는 상황이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명의 목적은, 식물성 단백질 조성물을 포함하는 다공성 세포 지지체를 제공하는데 있다.
- [8] 다른 목적은, 상기 다공성 세포 지지체를 제조하는 방법을 제공하는데 있다.
- [9] 또 다른 목적은, 상기 다공성 세포 지지체를 포함하는 배양육 제조용 조성물을 제공하는데 있다.
- [10] 또 다른 목적은, 상기 다공성 세포 지지체를 이용하여 배양육을 제조하는 방법을 제공하는데 있다.
- [11] 또 다른 목적은, 상기 방법에 의해 제조된 배양육을 제공하는데 있다.

과제 해결 수단

- [12] 일 양상은, 분리된 식물성 단백질, 포로젠(porogen) 및 유화제를 용제에 넣고 교반한 후 응고제를 첨가하여 수득된 다공성의 식물성 단백질 조성물을 포함하는 다공성 세포 지지체를 제공한다.
- [13] 용어, "식물성 단백질"은 식물체에 존재하는 단백질을 의미하며, 필수 아미노산을 모두 포함하지는 않으나, 플라보노이드, 안토시아닌 등 풍부한 항산화 물질들을 함유하고 있고, 이러한 항산화 물질은 면역력뿐만 아니라 노화를 늦추는데 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 또한, 베타글루칸, 펙틴 등 식이섬유가 풍부하여 동물성 단백질에서 채우지 못하는 영양소를 풍부하게 가지고 있는 것으로 알려져 있다.
- [14] 용어, "포로젠(porogen)"은 다공성 재료를 생성하기 위해 사용할 수 있는 임의의 물질을 의미하는 것으로, 기공 형성제, 기공 유도 물질이라고도 한다.
- [15] 상기 포로젠은 식용 가능한 것으로, 한천, 소금, 염화칼슘, 탄산나트륨, 파라핀, 폴리에틸렌글리콜, 젤라틴 및 수크로스로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 식용 가능하면서, 식물성 단백질에 기공을 형성할 수 있는 물질은 제한 없이 적용 가능할 수 있다.
- [16] 용어, "유화제"는 서로 혼합되기 어려운 두 물질이 잘 섞이도록 도와주는 물질을 의미한다.
- [17] 상기 유화제는 식용 가능한 것으로, 글리세린, 프로필렌글리콜, 모노글리세리드(monoglyceride), 다이글리세리드(diglyceride), 레시틴(lecithin) 및 대두 인지질로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 식용 가능하면서, 식물성 단백질과 포로젠을 잘 섞이도록 도와줄 수 있는 물질은 제한 없이 적용 가능할 수 있다.
- [18] 상기 용제는 식용 가능한 것으로, 글리세린, 프로필렌글리콜, 모노글리세리드(monoglyceride), 다이글리세리드(diglyceride), 레시틴(lecithin) 및

- 대두 인지질로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [19] 상기 유화제와 상기 용제는 동일한 물질일 수 있다. 임의의 물질이 유화제 및 용제의 역할을 동시에 수행할 수 있다.
- [20] 상기 응고제는 식용 가능한 것으로, 글루코노델타락톤(glucono- δ lactone), 염화칼슘, 황산칼슘 및 염화마그네슘으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [21] 상기 다공성 세포 지지체의 기공 크기는 10 내지 600 μm , 20 내지 550 μm , 30 내지 500 μm , 40 내지 450 μm , 50 내지 400 μm , 60 내지 350 μm , 70 내지 300 μm , 75 내지 250 μm , 80 내지 200 μm , 85 내지 150 μm , 70 내지 130 μm , 80 내지 120 μm , 90 내지 110 μm , 50 내지 600 μm , 50 내지 400 μm , 50 내지 300 μm , 50 내지 250 μm , 50 내지 200 μm , 50 내지 150 μm 일 수 있다.
- [22] 상기 다공성 세포 지지체의 탄성율은 1 내지 10 kPa, 2 내지 8 kPa, 3 내지 8 kPa, 1 내지 5 kPa, 4 내지 10 kPa, 6 내지 10 kPa, 1 내지 3 kPa, 또는 4 내지 6kPa일 수 있다.
- [23] 상기 다공성 세포지지체의 공극률은 10 내지 80%, 20 내지 80%, 30 내지 70%, 40 내지 60%, 30 내지 60%, 50 내지 80%, 또는 60 내지 80%일 수 있다.
- [24] 상기 다공성 세포지지체는 고체, 또는 반고체로 가역적인 상전이가 일어날 수 있다. 또한, 상기 다공성 세포 지지체는 불용성일 수 있다.
- [25] 상기 식물성 단백질은 견과류, 콩, 버섯, 채소 및 곡물로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상에서 분리된 것일 수 있다.
- [26] 일 구현예에서, 대두 단백질을 이용하여 다공성 세포 지지체를 제조할 수 있다.
- [27] 상기 다공성 세포 지지체 내에 세포가 분주될 수 있다.
- [28] 상기 다공성 세포 지지체의 용도는 3차원 세포 배양을 포함할 수 있다.
- [29] 일 구현예에서, 상기 다공성 세포 지지체에 다양한 유형의 세포가 부착, 증식 및 분화할 수 있다.
- [30] 일 구체예에서, 상기 다공성 세포 지지체 내에 지방 유래 줄기세포, 근육세포 또는 지방세포를 분주하여 3차원 배양할 수 있다.
- [31] 상기 다공성 세포 지지체는 세포를 안정적으로 및 지속적으로 배양할 수 있을 뿐만 아니라 세포마다 세포의 특성에 맞는 배양 양상을 나타낼 수 있는 효과가 있다. 또한, 일 구체예에 따른 다공성 세포 지지체는 세포 배양 디쉬 및 플레이트에서 배양하는 기존의 2D 배양 방법으로도 장기간 배양이 가능한 효과가 있다.
- [32] 상기 다공성 세포 지지체 내에 분주된 세포는 박테리아 세포, 효모 세포, 포유류 세포, 곤충 세포 및 식물 세포로 이루어진 군을 포함할 수 있다.
- [33] 상기 세포, 예를 들면, 진핵 세포는 효모, 곰팡이, 원생동물(protozoa), 식물, 고등 식물 및 곤충, 또는 양서류의 세포, 또는 CHO, HeLa, HEK293, 및 COS-1과 같은 포유 동물의 세포일 수 있고, 예를 들어, 당업계에서 일반적으로 사용되는,

배양된 세포(in vitro), 이식된 세포(graft cell) 및 일차 세포 배양(in vitro 및 엑스 비보(ex vivo)), 및 인 비보(in vivo) 세포, 및 또한 인간을 포함하는 포유동물의 세포(mammalian cell)일 수 있다. 또한, 상기 유기체는 효모, 곰팡이, 원생동물, 식물, 고등 식물 및 곤충, 양서류, 또는 포유 동물일 수 있다.

- [34] 상기 다공성 세포 지지체 내에 분주된 세포는, 연골세포; 섬유연골세포; 골세포; 골아세포; 파골세포; 윤활막세포; 골수세포; 신경세포; 지방세포; 간엽세포; 상피세포, 간세포, 근육세포; 기질세포; 혈관세포; 줄기세포; 배아줄기세포; 중간엽줄기세포; 지방세포; 지방 조직으로부터 유래된 전구세포; 말초혈액 전구세포; 성체조직으로부터 단리된 줄기세포; 유도만능줄기세포(iPS 세포), 이들로부터 유래된 종양세포 및 이들의 조합으로부터 선택된 어느 하나를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로, 상기 다공성 세포 지지체 내에 분주된 세포는 줄기세포, 지방세포, 지방 조직으로부터 유래된 전구세포 또는 근육세포일 수 있다.
- [35] 상기 다공성 세포지지체는 분주된 세포의 분화 또는 증식을 유도하기 위한 분화 유도 인자, 성장 인자, 성장 자극제, 생리활성 물질, 또는 세포 결합 매개 물질인 펩티드나 다당류 등을 더 포함할 수 있다.
- [36] 일 구현예에서, 상기 성장 인자 또는 성장 자극제는 세포 부착 매개체; 생물학적 활성 리간드; 인테그린 결합 시퀀스; 리간드; 다양한 성장 및/또는 분화 제제(예컨대, 상피세포 성장인자, IGF-I, IGF-II, TGF- β), 성장 및 분화 인자, 기질 유래 인자 SDF-1; 혈관내피 성장인자, 섬유아세포 성장인자, 혈소판 유래 성장인자, 인슐린 유래 성장인자 및 변형성 성장인자, 부갑상선 호르몬, 부갑상선 호르몬 관련 펩티드, bFGF; 신경 성장 인자(NGF) 또는 근육 형성 인자(MMF); 헤파린 결합 성장 인자(HBGF), 변형성 성장 인자 알파 또는 베타, 알파 섬유아세포성 성장인자(FGF), 상피세포 성장 인자(TGF), 혈관 내피 성장 인자(VEGF), SDF-1; TGF β 슈퍼패밀리 인자; BMP-2; BMP-4; BMP-6; BMP-12; 소닉 헤지호그; GDF5; GDF6; GDF8; PDGF); 특정 성장 인자의 상향 조절에 영향을 미치는 소분자; 테나신-C; 히알루론산; 콘드로이틴 설페이트; 피브로넥틴; 데코린; 트롬보플라스틴; 트롬빈 유래 펩티드; TNF 알파/베타; 매트릭스 메탈로프로티네이즈(MMP); 헤파린-결합 도메인; 헤파린; 헤파린 설페이트; 또는 이들의 DNA 절편, DNA 플라스미드, 작은 간섭 RNA(short interfering RNA, siRNA), 형질 감염체 또는 이의 임의의 혼합물이 포함될 수 있다.
- [37] 다른 양상은, 분리된 식물성 단백질, 포로젠 및 유화제를 용제에 넣고 교반하는 단계; 및 응고제를 첨가하여 다공성의 식물성 단백질 조성물을 수득하는 단계를 포함하는 다공성 세포 지지체를 제조하는 방법을 제공한다.
- [38] 상기 포로젠, 유화제, 용제 및 응고제에 관한 내용은 상기 기재한 바와 같다.
- [39] 상기 방법은 상기 응고제를 첨가하기 전에 성형하고 동결 건조하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 성형은 목적하는 모양 및 크기의 캐스팅 몰드에서 수행하는 것일 수 있다. 상기 동결 건조는 -40°C 내지 -240°C에서 10분 내지 3시간

동안 동결시킨 후, 건조시키는 단계를 포함할 수 있다.

- [40] 상기 동결 건조하는 단계에 있어서, 동결된 식물성 단백질 조성물의 전체 표면에 탄산수소나트륨을 도포한 후 실온에서 흡착시키는 단계를 포함할 수 있다. 상기 탄산수소나트륨은 식물성 단백질 조성물의 표면에 기공 형성을 촉진하여 조성물의 내부까지 응고제의 흐름을 원활하게 하는 역할을 할 수 있다. 상기 동결된 식물성 단백질 조성물에 탄산수소나트륨을 도포하지 않고 응고제를 첨가하는 경우에는 응고제가 조성물의 표면에 먼저 작용하면서 내부에 불규칙하게 기공이 형성되어, 세포를 배양하기에 부적합한 구조를 생성할 수 있다.
- [41] 또한, 상기 방법은 응고된 식물성 단백질 조성물을 증류수 또는 유기 용매(예를 들어, 에탄올)로 세척하고 고압 멸균 처리하여 단백질 이외의 불순물을 제거하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [42] 또 다른 양상은, 상기 다공성 세포 지지체; 및 상기 다공성 세포 지지체 내에 분주된 세포를 포함하는 배양육 제조용 조성물을 제공한다.
- [43] 용어 "배양육(cultured meat, synthetic meat, cell-cultured meat, clean meat, vat meat, in-vitro meat)은 살아있는 동물의 세포를 배양하여 축산농가 없이 고기를 배양하는 세포 공학 기술로 생산하는 살코기를 의미하며 인공육(artificial meat)이라고도 한다. 배양육은 아직은 상업적으로 생산을 하지 않으며 현재 몇몇 연구와 프로젝트에서 실험적으로 체외 고기 기술을 개발하고 있다.
- [44] 기존에 배양육을 제조하기 위해 사용되는 것으로 알려진 Cytodex 1[®] 마이크로캐리어와 일 구현예에서 제조한 식물성 단백질을 포함하는 다공성 세포 지지체의 특성을 비교한 결과는 하기의 표 1에 기재된 바와 같다.

[45] [표1]

	Cytodex 1®	본 발명의 일 구현예
Manufacturer	Cytiva (GE Healthcare)	DaNAgreen
Main ingredient	dextran	isolated soy protein
Main characteristics	(+)-surface charge	multiporous
Shape	spherical microcarrier	sponge-like sheet
Size	ø190 µm	25 x 25 x 2 mm
Max cell no. per gram	24 M	100 M
Scaffold no. per gram	172000	5
Max cell no. per scaffold	140	20 M
Cells attachment rate	~60%	100%
Price per 1kg meat	\$16,340	\$6.52
Price ratio	2506.1	1.0

- [46] Cytodex 1®에 대한 정보는 선행문헌 [Cytotechnology 2018 Apr;70(2):503-512]와 제조사의 홈페이지(www.cytivalifesciences.com)를 통해 취득하였으며, 상기 일 구현예에 대한 특성은 본 발명 전체에 제한되는 것이 아니며, 일 구현예에서 제조한 세포 지지체에 한정되는 것이다. 또 다른 양상은, 상기 다공성 세포 지지체에 세포를 분주하고 3차원 배양하여, 3차원 세포 집합체를 형성하는 단계를 포함하는 배양육 제조방법을 제공한다.
- [47] 상기 세포는 줄기세포, 근육세포 및 지방세포로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [48] 일 구현예에서, 상기 다공성 세포 지지체에 근육세포 또는 지방세포를 분주하고 3차원 배양하여 배양육을 제조할 수 있다. 또한, 상기 다공성 세포 지지체는 식용 가능한 재료로 구성되어 있으므로, 지지체로부터 배양된 세포를 분리하는 단계를 포함하지 않고 배양육을 제조할 수 있다.
- [49] 일 구현예에서, 상기 다공성 세포 지지체에 줄기세포를 분주하고 근육 또는 지방 조직으로 분화하도록 배양하여 배양육을 제조할 수 있다. 또한, 상기 다공성 세포 지지체는 식용 가능한 재료로 구성되어 있으므로, 지지체로부터 분화된 근육 또는 지방 조직을 분리할 필요 없이 바로 섭취할 수 있다.
- [50] 일 구현예에서, 세포와 다공성 세포 지지체를 바이오리액터 내에 투입하는 One-step 과정을 통하여 배양육을 제조할 수 있다. 하나의 배양기에 세포와 다공성 세포 지지체를 동시에 투입하면, 세포의 부착, 증식 및 분화가 한번에 발생하여 대량 생산 시스템을 구축할 수 있다.

[51] 또 다른 양상은, 상기 방법에 의해 제조된, 다공성 세포 지지체를 포함하는 배양육을 제공한다.

[52] 상기 다공성 세포 지지체 및 배양육에 관한 내용은 상기 기재한 바와 같다.

발명의 효과

[53] 일 구체예에 따른 식물성 단백질을 포함하는 세포 지지체 및 이를 이용하여 제조된 배양육은 식물성 단백질로 구성되어 있으므로 배양된 근육 또는 지방 조직을 지지체에서 별도로 분리하지 않고 함께 섭취할 수 있고, 근육 세포 및 지방 세포의 비율을 조절하여 바람직한 식감의 고기를 제조할 수 있으며, 세포 지지체에서 다양한 유형의 세포가 부착, 증식 및 분화가 가능하므로 배양육의 대량 생산에 있어서 유용하게 활용될 것이다.

도면의 간단한 설명

[54] 도 1은 일 구체예에서 제조한 식물성 단백질을 포함하는 다공성 세포 지지체를 촬영한 사진이다.

[55] 도 2는 기존에 알려진 세포 배양을 위한 지지체들의 형상을 나타낸 것으로, 도 2a는 오목 마이크로웰, 도 2b는 다공성 스캐폴드, 도 2c는 무공성 마이크로비드, 도 2d는 다공성 마이크로비드를 나타낸다.

[56] 도 3은 일 구체예에서 제조한 식물성 단백질을 포함하는 다공성 세포 지지체의 압축 강도를 측정하는 과정(도 3a) 및 그 결과(도 3b)이다.

[57] 도 4는 일 구체예에서 제조한 식물성 단백질을 포함하는 다공성 세포 지지체의 인장 강도를 측정하는 과정(도 4a) 및 그 결과(도 4b)이다.

[58] 도 5는 일 구체예에서 제조한 식물성 단백질을 포함하는 다공성 세포 지지체의 TPA(Texture Profile Analysis)를 측정하는 과정(도 5a) 및 그 결과(도 5b)이다.

[59] 도 6은 일 구체예에서 제조한 식물성 단백질을 포함하는 다공성 세포 지지체에 지방 유래 줄기세포를 분주하여 배양한지 9일차 및 15일차에 세포를 염색하여 촬영한 사진이다.

[60] 도 7은 일 구체예에서 제조한 식물성 단백질을 포함하는 다공성 세포 지지체를 이용하여 바이오리액터에서 배양육을 제조하는 과정을 나타낸 것이다.

[61] 도 8은 일 구체예에서 제조한 식물성 단백질을 포함하는 다공성 세포 지지체를 이용하여 배양 소고기, 배양 닭고기 및 배양 돼지고기를 배양하는 모습을 나타낸 것이다.

[62] 도 9는 일 구체예에서 제조한 다공성 세포 지지체를 이용하여 소의 근육세포를 배양하는 과정에서 13일차 및 20일차에 Live/dead assay를 수행하여 촬영한 사진(도 9a) 및 배양 전후의 세포 지지체 모습을 촬영한 사진(도 9b)이다.

[63] 도 10은 일 구체예에서 제조한 다공성 세포 지지체를 이용하여 소의 근육세포를 배양하는 과정에서 Calcein-AM/Desmin으로 염색하여 촬영한 사진이다.

[64] 도 11은 일 구체예에서 제조한 다공성 세포 지지체를 이용하여 소의

근육세포를 Phalloidin/Desmin으로 염색하여 촬영한 사진이다.

- [65] 도 12는 일 구현예에서 제조한 다공성 세포 지지체를 이용하여 닭의 심장 근육세포를 배양하는 과정에서 14일차에 Live/dead assay를 수행한 결과를 나타낸 것으로, 도 12a는 10% DMEM 배양 배지에서 7일 동안 배양한 후에 2% DMEM 배양 배지로 교체한 후 7일 동안 배양한 것이고, 도 12b는 10% DMEM 배양 배지에서 14일 동안 배양한 것이며, 도 12c는 2% DMEM 배양 배지에서 14일 동안 배양한 것이다.
- [66] 도 13은 일 구현예에서 제조한 다공성 세포 지지체를 이용하여 오골계의 근육세포를 배양하는 과정에서 13일, 17일 및 38일 차에 Live/dead assay를 수행한 결과이다.
- [67] 도 14는 일 구현예에서 제조한 다공성 세포 지지체를 이용하여 소의 근육세포와 닭의 근육세포를 배양하는 과정에서 14일차 및 8일차에 각각 Live/dead assay를 수행한 후 비교한 결과이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [68] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [69] **실시예 1. 식물성 단백질을 포함하는 다공성 세포 지지체의 제조**
- [70] 식물성 단백질을 포함하는 다공성 세포지지체를 다음과 같이 제조하였다.
- [71] 가루 형태의 분리 대두 단백질(isolated soy protein; ISP) 10 g 및 한천(agar) 2 g을 식용 글리세린(glycerin; 0409, ES 식품 원료) 10 ml에 넣고 10분 동안 60 rpm으로 스팀 교반(스팀믹서 D-201, Daeduck Machinery)기에서 혼합하였다. 그리고 나서, 멸균된 3차 증류수 30 ml을 첨가하고 고속교반기(MaXtir™ 500S, DAIHAN-brand®)를 사용하여 5,000rpm으로 10분 동안 교반시키고, 원하는 모양으로 성형하기 위해 캐스팅 몰드(100 mm X 100 mm X 2 mm)로 이동시킨 후, -80 °C에서 1시간 동결시켰다. 동결된 샘플 모든 면에 베이킹소다를 충분히 도포하여 실온에 4시간 동안 흡착시키고, 60°C에서 4시간 동안 건조시켰다. 멸균된 3차 증류수 1 L에 글루코노델타락톤(E575, JUNGBUNZLAUER S.A) 2 g을 첨가하고 시료를 80°C에서 2시간 동안 응고시킨 뒤, 상온에서 100% 에탄올과 멸균된 3차 증류수로 각각 5회 세척하고 3차 증류수 1 L에 담지하여 고압 멸균 2회 처리하여 단백질 외의 불순물을 제거하여 식물성 단백질 성분의 다공성 세포 지지체를 제조하였다(도 1).
- [72] 상기 다공성 세포 지지체를 제조하기 위한 모든 재료는 식품으로 허가된 원료를 사용하고 있으므로, 섭취하는 것이 가능하다.
- [73] **실시예 2. 다공성 세포 지지체의 특성 확인**
- [74] **실시예 2.1 다공성 세포 지지체의 형태적 특성 분석**
- [75] 실시예 1에서 제조한 세포 지지체의 형태적 특성을 SKYSCAN1272 ex-vivo

micro-CT(Bruker microCT, Belgium)를 사용하여 다음과 같은 조건에서 측정하였다.

- [76] - X-ray source: 40 kV, 200 uA, No-filter, rotation step 0.15°
- [77] - Resolution: 1 um pixel resolution
- [78] - 0.1% IKI(iodine-potassium iodide)로 밤새도록 염색
- [79] 단면 생성은 NRecon, 단면 회전은 DataViewer, 분석은 CTAn, Volume rendering 생성은 CTVox, surface rendering은 CTAn+CTVol software를 사용하여 분석하였으며, 그 결과는 하기 표 2에 기재된 바와 같다.

[80] [표2]

	약어	측정값	단위
Percent object volume	Obj.V/TV	40.91257477	%
Structure thickness	St.Th	0.02461021	mm
Structure separation	St.Sp	0.09660629	mm
Open porosity	Po(op)	58.55148608	%
Total porosity	Po(tot)	59.08742523	%
Pore interconnectivity		58.55/59.09 = 99.1	%

- [81] - Percent object volume(비공극률): 지지체가 차지하는 부피 비율을 의미한다.-
- [82] Structure thickness(구조물 두께): 기공 사이 평균 간격을 의미한다.
- [83] - Structure separation(구조물 분리): 기공의 평균 크기를 의미한다.
- [83] - Open porosity(개방 공극률): 지지체 전체 부피에 대하여 외부와 연결되어 있는 기공이 차지하는 비율을 의미한다.
- [84] - Total porosity(전체 공극률): 지지체 전체 부피에 대하여 기공이 차지하는 비율을 의미한다.
- [85] - Pore interconnectivity(기공 상호연결성): 전체 기공 중에서 외부와 연결된 기공의 비율을 의미한다.
- [86] 이를 통하여, 실시예 1에서 제조한 세포 지지체의 기공 상호연결성이 약 99%이므로, 세포의 이동과 배양액의 흐름이 원활하여 다양한 세포의 성장 및 분화에 적합한 것을 확인하였다.
- [87] 실시예 2.2 다공성 세포 지지체의 물리적 특성 분석
- [88] 실시예 1에서 제조한 세포 지지체의 물성을 분석하기 위하여, 재료 물성 분석기인 TXA™ Texture Analyzer(주식회사 연진에스텍)를 사용하여 다음과 같이 압축 강도 측정, 인장 강도 측정 및 Texture profile analysis(TSA)를 수행하였다.
- [89] 압축 강도는 Compression Test Method를 이용하여 측정하였다. 샘플을 플레이트에 놓은 후 가로, 세로 각각 10 mm인 사각 probe로 압축한 후에 Initial

strain rate을 각각 0.1[1/s] 와 0.033[1/s]로 설정하여 측정하였다(도 3a). 그 결과는 하기 표 3 및 도 3b에 나타난 바와 같다.

[90] [표3]

Testing Method	Compression Test			Temperature			21.6 degree Celsius
Number of Lot				Humidity			Ambient
Product Specification				Load Cell			30kgf
	Width mm	Thick mm	Length mm	Speed mm/s	Max Load gf	Max Stress kPa	
0.1 Strain rate_1	7.765	7.260	1.778	0.178	724.368	126.009	
0.033 Strain rate	7.726	7.650	1.689	0.051	637.388	105.756	
Average	7.746	7.455	1.734	0.114	680.878	115.882	
Standard deviation	0.028	0.276	0.063	0.090	61.504	14.320	
Standard deviation(%)	0.4	3.7	3.6	78.7	9.0	12.4	

[91] 인장 강도는 샘플을 인장 grip에 물린 후, Initial strain rate 을 각각 0.1[1/s] 와 0.033[1/s]로 설정하여 측정하였다(도 4a). 그 결과는 하기 표 4 및 도 4b에 나타난 바와 같다.

[92] [표4]

Testing Method	Tensile Test			Temperature		21.6 degree Celsius		
Number of Lot				Humidity		Ambient		
Product Specification				Load Cell		30 kgf		
	Width mm	Thick mm	Length mm	Speed mm/s	Yield Load gf	Yield Stress kPa	Yield Elong. %	Max Load gf
Tensile Test 0.1 Strain rate	14.000	1.500	20.000	2.033	60.209	28.117	16.000	120.820
Tensile Test 0.033 Strain rate	14.000	1.500	20.000	0.617	52.489	24.511	14.297	116.659
Average	14.000	1.500	20.000	1.325	56.349	26.314	15.148	118.739
Standard deviation	0.000	0.000	0.000	1.001	5.459	2.549	1.204	2.942
Standard deviation(%)	0.0	0.0	0.0	75.5	9.7	9.7	7.9	2.5

[93] TPA(Texture Profile Analysis)는 texture analyzer기를 사용하여, 샘플을 플레이트에 놓은 후 가로, 세로가 모두 25.4 mm이고, 직경이 mm인 cylinder probe를 60 mm/min 속도로 2번 50% 압축하여 측정하였다(도 5a). 그 결과는 하기 표 5 및 도 5b에 나타난 바와 같다.

[94] [표5]

	시각폭 WIDTH	시각두께 THICK	단면적 S.A	표면거리 G.L	시속속도 SPEED	Hardness	Adhesiveness	Cohesiveness	Springiness	Gumminess	Chewiness	Resilience	Brittleness
	mm	mm	mm ²	mm	mm/min	kgf	kgf/sec	-	-	-	-	-	kgf
TPA.1	14.70	12.70	186.69	7.60	300.00	0.6729	0.0027	0.81	0.99	0.55	0.54	0.55	0.6729
TPA.2	14.20	13.70	194.54	7.64	300.00	0.6418	0.0019	0.82	1.02	0.53	0.54	0.55	0.6417
TPA.3	14.00	14.50	203.00	7.50	300.00	0.6922	0.0029	0.81	0.98	0.56	0.55	0.54	0.6921
Average	14.30	13.63	194.74	7.58	0.00	0.6689	0.0023	0.82	1.00	0.55	0.54	0.55	0.6689
Stand Dev.	0.36	0.90	8.16	0.07	0.00	1.6388	0.0057	2.00	2.44	1.34	1.33	1.34	1.6387

- [95] - Hardness(경도): 원하는 변형에 도달하는데 필요한 힘을 의미한다.
- [96] - Cohesiveness(응집성): 물체가 있는 그대로의 형태를 유지하려는 힘을 의미하고, Adhesiveness(부착성) 보다 클 경우 Probe에 샘플이 묻어나지 않는다.
- [97] - Springiness(탄력성): Elasticity라고도 하며, 압축에 의해 변형된 샘플이 힘이 제거된 후 원래의 상태로 돌아가려는 성질을 의미한다.
- [98] - Gumminess(점착성): 반고체 상태의 샘플을 삼킬 수 있는 상태가 될 때까지 분해하는데 필요한 힘을 의미한다.
- [99] - Chewiness(씹힘성): 고체 상태의 샘플을 삼킬 수 있는 상태로 만드는데 필요한

에너지를 의미한다.

- [100] - Brittleness(깨어지는 성질): 압축에 의해 부서지거나 깨어지는 성질을 의미하며, 첫 압축의 최대 힘에 도달하기 전에 등장하는 중간 peak로 샘플에 따라 이 성질이 안 나타나는 경우도 있다.
- [101] - Resilience(탄성복원성): 샘플이 원래 높이를 회복하고자 하는 성질을 의미한다.
- [102] 이를 통하여, 실시예 1에서 제조한 세포 지지체는 근육세포의 성장 및 분화에 적합한 압축 강도 및 인장 강도를 가졌으며, 배양육을 제조하는데 활용되기 위한 식용 세포 지지체로서 적당한 탄성 및 복원성을 나타내므로 식감이 좋고, 적당한 경도와 점착성을 나타내므로 부드러운 삼킴성을 가지는 것을 확인하였다.
- [103] **실시예 2.3 기존의 세포 지지체와의 특성 비교**
- [104] 기존에 공지된 세포 지지체들(오목 마이크로웰, 다공성 스캐폴드, 무공성 마이크로비드, 다공성 마이크로비드)과 실시예 1에서 제조한 다공성 세포 지지체의 특성을 비교한 결과는 하기 표 6에 기재된 바와 같다. 기존에 공지된 세포 지지체들의 특성은 선행문헌 [Materials Science & Engineering C 103 (2019) 109782]를 참조하였다. 기존에 공지된 세포 지지체들의 형태는 도 2에 나타내었다.

[105] [표6]

	Concave Microwell (a)	Porous Scaffold (b)	Non-porous microbead (c)	Porous Microbead (d)	실시예 1
Cell adhesion	N/A	***	***	***	*****
Media diffusion to the cells	*	***	*****	*****	*****
Enduranc e in bioreacto rs	*	*	*****	***	*****
Cell density when fully attached	N/A	*	***	*****	*****
Price	*****	*	***	*	*****
Material	Scaffold-free	Plastic	Plastic/Protein	Plastic/Protein	Protein
Suitabilit y for cultured meat productio n	Research use products only	Research use products only	Not enough yield, aggregation occurs	Not strong enough to be used in bioreactors	Great for cultured meat application

[106] 이를 통하여, 실시예 1에서 제조한 세포 지지체는 기존의 세포 배양을 위한 지지체들과 비교하여 세포 부착성이 높고, 배양액 투과성이 뛰어나며, 높은 내구성을 가지고, 배양육을 제조하기에 적합한 재료로 이루어진 것을 확인하였다.

[107] 실시예 3. 다공성 세포 지지체를 이용한 세포의 3차원 배양

[108] 배양 접시에 실시예 1에서 제조한 지름 10 mm, 두께 2 mm의 크기의 다공성 세포 지지체를 올린 후 10% Mesenchymal stem cell growth medium 2 (Promocell

- C-28009, C-39809) 배양 배지를 넣고 지방 유래 줄기세포주(ATCC PCS-500-011) 5.0×10^5 개를 분주한 후 15일 동안 배양하여 세포를 증식 및 조직화하였다.
- [109] 그 결과, 배양 기간이 경과할수록 세포의 성장이 지속적으로 진행되며, 세포가 지지체에 부착하여 성장하면서 지지체가 수축하고, 세포의 수가 늘어 나면서 공극(void volume)을 최소화시키며 조직(tissue)을 형성하는 것을 확인하였다(도 6).
- [110] **실시예 4. 다공성 세포 지지체를 이용한 배양육의 제조**
- [111] 실시예 1에서 제조한 다공성 세포 지지체를 이용하여 배양육을 제조하였다. 바이오리액터 내에 소의 근육세포, 닭의 근육세포 및 돼지의 근육세포 각각을 실시예 1에서 제조한 세포 지지체와 바로 투입하여 일괄적으로 세포를 배양하는 방법(도 7)을 통하여 배양 소고기, 배양 닭고기 및 배양 돼지 고기를 제조하였다(도 8). 이를 통하여, 하나의 배양기에 세포와 다공성 세포 지지체를 동시에 투입하면, 세포의 부착, 증식 및 분화가 한번에 발생하는 One-step 대량 배양 시스템을 구축할 수 있는 것을 확인하였다.
- [112] **실시예 4.1. 다공성 세포 지지체를 이용한 배양 소고기의 제조**
- [113] 배양 접시에 25 mm X 25 mm X 2 mm의 크기의 실시예 1에서 제조한 다공성 세포 지지체, Bovine #1 세포((주)부농축산에서 당일 도축한 36개월령의 한우 암소(도체중: 339kg, 2등급)의 우둔살(rump) 근육 부위 150g으로부터 다나그린에서 1차 근육 세포(primary skeletal muscle cells)를 추출함) 1.7×10^6 개 및 10% DMEM, 2% DMEM(DMEM biowest L0103-500, FBS biowest S1480-500) 배양 배지를 넣고 진탕 배양기에 24시간 동안 배양한 결과, 2~3%의 잔여 세포를 제외하고는 모든 세포가 다공성 세포 지지체에 분주된 것을 확인하였다.
- [114] 또한, 4주 동안 배양하는 과정에서 13일차 및 20일 차에 live & dead assay 수행한 결과, 지지체 내에서 dead cells이 거의 관찰 되지 않았으므로 세포 부착이 잘 이루어졌으며, 일주일 사이에 live cells이 증가한 것을 통하여 세포 지지체 상에서 세포 증식이 잘 이루어지고 있음을 확인하였다(도 9a). 뿐만 아니라, 배양 전후의 지지체를 육안으로 관찰한 결과, 배양 후의 지지체는 배양 전의 지지체와 달리 연분홍색으로 변한 것을 통하여, 세포 지지체 상에서 근육세포 증식이 이루어진 것을 확인하였다(도 9b).
- [115] 25 mm X 25 mm X 2 mm의 크기의 실시예 1에서 제조한 다공성 세포 지지체에 10% DMEM, 2% DMEM(DMEM biowest L0103-500, FBS biowest S1480-500) 배양 배지를 넣고 Bovine #2 세포(삼호축산에서 당일 도축한 23개월령의 한우 암소(도체중: 261kg, 2등급)의 우둔살(rump) 근육 부위 150g으로부터 다나그린에서 추출한 1차 근육 세포(primary skeletal muscle cells)) 1.0×10^6 개를 분주한 후, 7일 동안 배양하였다.
- [116] 배양이 완료된 후, Calcein-AM 및 Desmin Ab(도 10)와 Desmin Ab 및 Phalloidin(도 11)으로 각각 염색한 후 관찰하였다. Calcein-AM를 이용하여 살아있는 세포의 관찰 및 분화된 세포의 형태를, 근육세포 마커인 Desmin Ab를

이용하여 분화된 근육세포를, Phalloidin을 이용하여 분화된 세포의 형태를 확인하기 위함이었다. 그 결과, 지지체 내에서 근육세포로의 분화가 잘 이루어지고 있음을 확인하였다.

- [117] 이를 통하여, 실시예 1에서 제조한 다공성 세포 지지체 상에서 소의 근육세포를 배양하여 배양 소고기를 제조할 수 있음을 확인하였다.
- [118] 실시예 4.2. 다공성 세포 지지체를 이용한 배양 닭고기의 제조
- [119] 25 mm X 25 mm X 2 mm의 크기의 실시예 1에서 제조한 다공성 세포 지지체에 10% DMEM 배양 배지를 넣고 Chicken Cardiomyocyte #1 세포(다나그린에서 부화 9~11일차 일반 산란계(layer chicken)의 유정란으로부터 embryonic body를 꺼내어 심장에서 추출한 1차 심장 근육 세포(primary cardiomyocyte)) 5.0×10^5 개를 분주한 후, 7일 동안 배양하여 세포를 증식시켰다. 7일 후에, 배양 배지를 2% DMEM 교체한 후, 7일 동안 배양하여 심근세포로 분화시켰다. 배양한 지 14일 차에, live & dead assay를 수행한 결과, 전반적으로 세포가 잘 배양되어 배양육이 생성되고 있음을 확인하였다(도 12a).
- [120] 또한, 25 mm X 25 mm X 2 mm의 크기의 실시예 1에서 제조한 다공성 세포 지지체에 10% DMEM 배양 배지 및 2% DMEM 배양 배지를 각각 넣고 Chicken Cardiomyocyte #1 세포(다나그린에서 부화 9~11일차 일반 산란계(layer chicken)의 유정란으로부터 embryonic body를 꺼내어 심장에서 추출한 1차 심장 근육 세포(primary cardiomyocyte)) 1.0×10^6 개를 각각 분주한 후, 14일 동안 배양하였다. 14일 후, live & dead assay를 수행한 결과, 전반적으로 세포가 잘 배양되어 배양육이 생성되고 있음을 확인하였다(도 12b 및 도 12 c).
- [121] 이를 통하여, 실시예 1에서 제조한 다공성 세포 지지체 상에서 닭의 근육세포를 배양하여 배양 닭고기를 제조할 수 있음을 확인하였다.
- [122] 또한, 배양 접시에 25 mm X 25 mm X 2 mm의 크기의 실시예 1에서 제조한 다공성 세포 지지체에 10% DMEM, 2% DMEM(DMEM biowest L0103-500, FBS biowest S1480-500) 배양 배지를 넣고, Silkie #1 세포(다나그린에서 부화 9~11일차 오골계(silkie)의 유정란에서 embryonic body를 꺼내어 허벅지 부위에서 추출한 1차 근육 세포(primary skeletal muscle cells)) 1.0×10^7 개를 분주한 후, 5주 동안 배양하였다.
- [123] 배양한 지 13일, 17일, 38일 차에 live & dead assay를 수행한 결과, 세포 지지체 상에서 오골계 근육세포의 증식 및 분화가 잘 이루어지고 있음을 확인하였다(도 13). 구체적으로, 2주 차에 세포 지지체 상에 live cells이 가득하였으며, 5주 차까지도 세포의 viability이 가능한 것을 확인하였다.
- [124] 실시예 4.3. 다공성 세포 지지체를 이용하여 제조한 배양 소고기 및 배양 닭고기의 비교
- [125] 25 mm X 25 mm X 2 mm의 크기의 실시예 1에서 제조한 다공성 세포 지지체에 10% DMEM, 2% DMEM(DMEM biowest L0103-500, FBS biowest S1480-500) 배양 배지를 넣고, Bovine #1 세포 1.0×10^6 개 및 Chicken #1 세포 2.0×10^6 개를 각각

분주한 후, 4주 동안 배양하였다.

- [126] 배양하는 과정에서 Bovine는 14일 차에, Chicken은 8일 차에 live & dead assay를 수행하여 그 결과를 비교하였다(도 14). 치킨 세포는 소 세포에 비해 크기가 작고 doubling time이 빠른 편으로 같은 기간 배양했을 경우 지지체를 훨씬 단기간 내에 채워 나감을 확인하였다. 또한, 두 배양육 모두 세포 지지체에 의해 세포 특성이 저해되지 않았으며, 배양육의 종류에 따라 근섬유의 형태가 다르므로 이에 따른 맛과 풍미가 차이가 나는 것을 확인하였다.

청구범위

- [청구항 1] 분리된 식물성 단백질, 포로젠(porogen) 및 유화제를 용제에 넣고 교반한 후 응고제를 첨가하여 수득된 다공성의 식물성 단백질 조성물을 포함하는 다공성 세포 지지체.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서,
상기 포로젠은 한천, 소금, 염화칼슘, 탄산나트륨, 파라핀, 폴리에틸렌글리콜, 젤라틴 및 수크로스로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인, 다공성 세포 지지체.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서,
상기 유화제 또는 용제는 글리세린, 프로필렌글리콜, 모노글리세리드, 다이글리세리드, 레시틴 및 대두 인지질로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인, 다공성 세포 지지체.
- [청구항 4] 청구항 1에 있어서,
상기 응고제는 글루코노델타락톤, 염화칼슘, 황산칼슘 및 염화마그네슘으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인, 다공성 세포 지지체.
- [청구항 5] 청구항 1에 있어서,
상기 다공성 세포 지지체의 기공 크기는 50 내지 400 μm 인, 다공성 세포 지지체.
- [청구항 6] 청구항 1에 있어서,
상기 식물성 단백질은 견과류, 콩, 버섯, 채소 및 곡물로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상에서 분리된 것인, 다공성 세포 지지체.
- [청구항 7] 청구항 1에 있어서,
상기 다공성 세포 지지체 내에 세포가 분주되는 것인, 다공성 세포 지지체.
- [청구항 8] 청구항 1에 있어서,
3차원 세포 배양을 위한 것인, 다공성 세포 지지체.
- [청구항 9] 분리된 식물성 단백질, 포로젠 및 유화제를 용제에 넣고 교반하는 단계; 및
응고제를 첨가하여 다공성의 식물성 단백질 조성물을 수득하는 단계를 포함하는 다공성 세포 지지체를 제조하는 방법.
- [청구항 10] 청구항 1의 다공성 세포 지지체; 및 상기 다공성 세포 지지체 내에 분주된 세포를 포함하는 배양육 제조용 조성물.
- [청구항 11] 청구항 1의 다공성 세포 지지체에 세포를 분주하고 3차원 배양하여, 3차원 세포 집합체를 형성하는 단계를 포함하는 배양육 제조방법.
- [청구항 12] 청구항 11에 있어서,
상기 세포는 줄기세포, 근육세포 및 지방세포로 구성된 군에서 선택되는

하나 이상인, 배양육 제조방법.
[청구항 13] 청구항 11에 기재된 방법에 의해 제조된, 다공성 세포 지지체를 포함하는 배양육.