

명세서

발명의 명칭: 동물세포 또는 동물 세포주의 배양방법

기술분야

- [1] 본 발명은 동물세포 배양용 배지 조성물, 이를 이용한 동물세포의 배양방법, 비-인간 동물 세포주의 제조방법, 이에 따라 제조된 세포주 및 세포주의 배양방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 인구의 지속적인 증가와 함께 환경오염에 대한 문제점이 대두되고 있으며 특히, 해양 환경 오염에 대한 문제점이 심각한 수준으로 심화되고 있다. 1960년 대 이후로 환경 오염과 무분별한 어획으로 몇몇의 종은 지속 가능하지 않은 수준까지 도달하게 되었다. 쓰레기에 걸려 해양 생물들이 질식사할 하기도 하지만 더 심각한 문제는 바다에 떠다니는 플라스틱 쓰레기들이 자외선에 직접적으로 노출되어 미세 플라스틱을 만들어 낸다는 점이다. 이렇게 만들어진 미세플라스틱들은 해양 생물들의 몸에 점진적으로 축적되어 생체내 여러 질병을 유발해 해양 생물들의 생존을 위협한다. 뿐만 아니라 미세플라스틱이 축적된 해양 생물들을 섭취하는 인간에게도 미세플라스틱이 축적되고 있다는 점도 심각하게 받아들여지고 있다. 또한 온난화에 따른 급격한 기후 변화로 인해 해수의 온도가 점차 증가함에 따라 해양 생물체 중 감소를 더욱 더 부추기고 있다.
- [3] 이러한 해양 생태계의 파괴에도 불구하고 인구의 증가에 따른 해양자원의 수요는 증가하고 있으며, 그 중 새우, 게 및 랍스터와 같은 갑각류에 대한 수요는 지속적인 증가 추이를 보이고 있다. 이렇게 늘어나는 수요를 공급하기 위해 양식업이 증가하게 되었는데 그로 인해 여러 부작용도 함께 뒤따라오게 되었다. 하지만 양식업의 증가로 지구 온난화의 주요 물질인 탄소가스 배출이 더욱 심화되었으며 결국 수요를 채우기 위한 공급 방법이 새로운 환경 오염을 야기시키고 있다. 또한 양식 공간을 조성하면서 온난화의 원인 물질 중 하나인 탄소를 흡수하는 기능을 하는 연안생태계와 같은 생태계 자원을 파괴한다. 또한 밀집된 공간에 집단 서식으로 인해 인근 해역에 노폐물 증가에 의한 오염 및 바이러스의 감염에 의한 집단폐사가 발생할 수 있는 위험성도 내재하고 있다.
- [4] 환경 오염을 억제하고 수요를 충족시키기 위한 방법으로 배양육이 해결책으로 제시되고 있다. 배양육은 하나의 개체에서 세포를 추출하고 증식시켜 여러 개의 개체를 만들어 낼 수 있으므로 탄소 가스의 배출량을 줄일 수 있고, 면적 대비 높은 생산량을 보인다. 또한, 배양육은 실험실의 배양기 내에서 세포를 증식시키므로, 바다에서 어획되는 수산물과는 다르게 중금속과 미세 플라스틱에 오염되지 않은 안전한 먹거리를 제공할 수 있는 장점이 있으며, 지속가능하고 해양 환경을 파괴하지 않는다는 장점이 있다.

- [5] 배양육을 개발 및 생산하기 위해서는 세포 추출 기술과 세포 증식 기술 그리고 세포 맞춤 배양액이 반드시 조합되어야만 하며, 상용화를 위해서는 배양액 가격 절감이 가장 큰 문제로 알려져 있다. 일반적으로 단백질, 아미노산, 호르몬 등이 포함되어 있는 우태아혈청 (FBS; Fetal bovine serum)을 5~20% 첨가하여 세포를 배양하며 우태아혈청을 세포배양에서 필수적으로 생각되고 있으며, 세포의 성장과 증식에 매우 효과적이지만 소 태아의 혈액에서 직접적으로 추출하므로 매우 비윤리적이고 상당히 고가라는 단점이 있다.
- [6] 또한, 배양육을 상용화 하기 위해 가장 중요한 것은 배양육 생산 가격의 절감이며, 배양육을 생산하기 위한 가격 절감에 가장 큰 영향을 미치는 것은 세포 배양액이다. 배양육의 배양시 사용되는 기본 배양액에는 다양한 성분들이 첨가되어 있는데, 이러한 성분을 첨가하지 않은 배양액을 사용하여 배양육을 생산할 수 있다면 가격 절감에 큰 도움을 줄 수 있다.
- [7] 또한, 갑각류 배양육을 제작하는 주요 기술로는 만들고자 하는 배양육 개체의 조직에서 세포를 분리하고 배양하는 기술을 확립하는 것인데, 종전(George et al., In Vitro Cell.Dev.Biol.-Animal 2010)에 새우에서 근육 세포를 분리하여 배양하는 방법이 보고된 바 있으나 증식능의 제한이 있어 일정 시간 (<7일) 배양 후 세포가 더이상 자라지 않는 것을 보였다.
- [8] 이에 본 발명자들은 혈청 또는 다양한 성분 없이도 갑각류 세포의 성장 및 증식이 활발히 진행되는 배양액, 갑각류에 공통적으로 적용할 수 있는 세포 분리 방법 및 증식능의 제한이 없는 효과적인 세포 배양 방법을 개발하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 일 양상은 효모 추출물 또는 펩톤(Peptide)을 포함하는 동물세포 배양용 배지 조성물을 제공하는 것이다.
- [10] 다른 양상은 기본 배지 및 효모 추출물을 포함하는 동물세포 배양용 배지 조성물을 제공하는 것이다.
- [11] 또 다른 양상은 효모 추출물 또는 펩톤(Peptide)을 포함하는 동물세포 배양용 배지 조성물에서 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 동물세포의 배양 방법을 제공하는 것이다.
- [12] 또 다른 양상은 기본 배지 및 효모 추출물을 포함하는 동물세포 배양용 배지 조성물에서 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 동물세포의 배양 방법을 제공하는 것이다.
- [13] 또 다른 양상은 비-인간 동물로부터 세포를 분리하는 단계; 및
- [14] 상기 분리된 세포를 현탁배양하는 단계
- [15] 를 포함하는, 세포주의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [16] 또 다른 양상은 상기 제조방법에 따라 제조된 세포주를 제공하는 것이다.

- [17] 또 다른 양상은 상기 세포주를 증식시키기 위한 현탁배양을 수행하는 단계를 포함하는 세포주의 배양방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [18] 일 양상은 효모 추출물 또는 펩톤(Peptide)을 포함하는 동물세포 배양용 배지 조성물을 제공한다.
- [19] 다른 양상은 기본 배지 및 효모 추출물을 포함하는 동물세포 배양용 배지 조성물을 제공한다.
- [20] 또 다른 양상은 효모 추출물 또는 펩톤(Peptide)을 포함하는 동물세포 배양용 배지 조성물에서 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 동물세포의 배양 방법을 제공한다.
- [21] 또 다른 양상은 기본 배지 및 효모 추출물을 포함하는 동물세포 배양용 배지 조성물에서 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 동물세포의 배양 방법을 제공한다.
- [22] 일 구체예에 있어서, 상기 배지 조성물은 상기 효모 추출물 또는 펩톤(Peptide)을 0.01 내지 20, 0.01 내지 10, 0.6 내지 10 또는 0.6 내지 2% (w/v)로 포함하는 것일 수 있다.
- [23] 펩톤은 각종 단백질을 효소 분해하거나 가수 분해할 때 생성되는 생성물의 총칭으로 폴리펩티드, 아미노산, 미네랄 등의 성분이 혼합되어 있다.
- [24] 일 구체예에 있어서, 상기 펩톤은 동물성 펩톤, 박테리아 펩톤 또는 식물성 펩톤일 수 있으며, 바람직하게는 식물성 펩톤일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [25] 상기 동물성 펩톤은 미트(meat) 및/또는 카제인(casein)일 수 있다.
- [26] 상기 박테리아 펩톤은 박토 펩톤(Bacto peptide)일 수 있다.
- [27] 일 구체예에 있어서, 상기 식물성 펩톤은 대두 펩톤(soy peptide), 밀 펩톤(wheat peptide), 참두 펩톤(broadbean peptide), 감자 펩톤(potato peptide), 완두콩 펩톤(pea peptide), 파파익 대두 펩톤(Papaic soy peptide) 및 루핀 펩톤(lupin peptide)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있으며, 바람직하게는 대두 펩톤일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [28] 본 명세서에 있어서, 용어 "식물성 펩톤"은 식물로부터 얻은 단백질의 분해 산물을 의미한다. 예를 들어 대두 펩톤(soy peptide)은 대두(soy)로부터 얻은 총단백질을 분해하여 얻은 산물을 의미한다. 상기 식물성 단백질의 분해는 부분적 분해(partial digest)에 의해 행해질 수 있다. 상기 단백질의 분해는 산처리, 염기처리, 효소처리, 고압처리, 열처리 또는 물리적 처리에 의한 분해를 통해 행해질 수 있다. 상기 물리적 처리는 예컨대 그라인딩(grinding)이다.
- [29] 본 발명에서 식물성 펩톤은 식물성 단백질의 부분적 분해 산물로서, 단분자인 아미노산뿐만 아니라, 수개 내지 수십개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드와 온전한 단백질 분자가 모두 포함되어 있는 혼합물 형태일 수 있다.

- [30] 본 발명의 식물성 펩톤이 얻어지는 식물의 원천은 특별히 한정되지 않으며, 세포 증식을 촉진하는 능력을 갖는다면 어떠한 식물로부터 유래된 펩톤이라도 모두 포함된다.
- [31] 본 발명의 배지 조성물은 미생물 추출물을 포함할 수 있으며, 미생물은 식용 가능한 것일 수 있다.
- [32] 상기 미생물은 박테리아, 고세균 또는 효모일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [33] 본 명세서에 있어서, 용어 "효모 추출물"은 효모를 배양한 후 NaCl, 에탄올 또는 효소처리 등에 의한 자가소화를 통해서 생산되므로 산분해 HVP(Hydrolyzed vegetable protein)와 같은 유해 물질 생성의 문제를 유발하지 않는 천연의 생물소재를 의미하며, 미생물 발효배지 또는 천연 조미료의 등에 사용되고 있다.
- [34] 상기 효모 추출물은 식용 효모에 식용이 가능한 효소류를 첨가하여, 식용 효모의 폴리펩타이드를 가수분해하는 방법으로 만들어질 수 있으며, 식용으로 사용 가능한 것일 수 있다.
- [35] 일 구체예에 있어서 상기 효모 추출물은 식품에 사용가능한 것일 수 있다.
- [36] 효모 추출물은 무기질, 비타민, 핵산, 펩타이드 및 아미노산 등을 포함하는 것으로 알려져 있다.
- [37] 일 구체예에 있어서, 상기 효모는 사카로마이세스 속(*Saccharomyces* sp.), 위커하모마이세스 속(*Wicherhamomyces* sp.), 피키아 속(*Pichia* sp.) 및 한세니아스포라 속(*Hanseniaspora* sp.)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있다.
- [38] 상기 식물성 펩톤과 상기 효모 추출물은 식물 또는 미생물 유래 성분으로 동물성 성분을 대체하는 성분일 수 있다. 상기 식물 또는 미생물 유래 성분은 바이오 의약품 및 식품 용도를 목적으로 사용하기에 매우 적합하다.
- [39] 일 구체예에 있어서, 상기 동물세포는 근육줄기세포, 근육세포 및 이의 전구세포(progenitor)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다.
- [40] 상기 근육줄기세포는 위성 세포(satellite cell) 또는 근아세포(myoblast), 예를 들어, 근아세포일 수 있으나, 이에 한정되지 아니한다.
- [41] 본 명세서에서 용어, "근육줄기세포(Muscle stem cell)"는 형질전환 없는 증식, 무한증식, 자가 재생산 능력 및 근육으로의 분화할 수 있는 능력을 모두 포함하는 근육줄기세포의 특성을 갖는 세포를 의미하며, 자가 재생산능력 또는 무한증식 능력 및 근육분화 능력을 보이는 세포라면 제한 없이 포함될 수 있다. 상기 자가 재생산 능력 및 근육 분화능력은 마커로서 확인이 가능하다. 또한 상기 근육줄기세포는 예를 들면 자가 재생능과 함께, CD29, CD56, Oct4, Nanog 또는 Pax7의 발현을 보이는 세포일 수 있다. 상기 근육줄기세포는 분화능과 자기재생능을 갖는 것이라면, 그 종류 및 유래가 제한되지 아니한다. 상기 근육줄기세포는, 예를 들면, 포유동물, 인간, 원숭이, 돼지, 말, 소, 닭, 오리, 양, 개, 고양이, 마우스 또는 토끼 등으로부터 유래한 것일 수 있다. 일 구체예에 있어서, 상기 근육줄기세포는 소 또는 닭의 근육줄기세포일 수 있다.

- [42] 상기 근육줄기세포는 근모세포(myoblast)로 유도되는 과정에서 Pax7 또는 MyoD의 발현을 보이는 세포일 수 있다.
- [43] 본 명세서에서 용어 "근모세포"는 근육세포로 분화하는 과정 중의 전구세포(precursor cell)로 근원세포와 마찬가지로 증식을 하며 세포 간에 융합이 일어나서 근육세포(myogenic cell, myocyte)로 분화할 수 있는 세포를 의미한다.
- [44] 본 명세서에서 용어 "근육세포"는 근모세포의 분화 과정을 통해, 근모세포로부터 생성된 근조직을 구성할 수 있는 세포를 의미한다.
- [45] 상기 근육세포는 근세포(myocyte) 또는 근관세포(myotube), 예를 들어, 근세포일 수 있으나, 이에 한정되지 아니한다.
- [46] 상기 전구세포는 복수 계통으로 분화된 세포를 생성시킬 수 있는 세포, 예컨대, 근아세포, 섬유아세포, 지방세포, 간질 세포, 주피세포, 평활근 세포 및 내피 세포를 지칭한다. 전구세포는 이들이 전형적으로 광범위한 자기 복제 능력을 갖지 않는다는 점에서 줄기 세포와는 상이하다.
- [47] 상기 동물세포는 지방 세포(fat cell 또는 adipocyte) 및/또는 이의 전구 세포, 간질 세포(결합조직) 및/또는 이의 전구 세포, 또는 내피 세포(혈관) 및/또는 이의 전구 세포를 더 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 아니한다.
- [48] 일 구체예에 있어서, 상기 동물은 소, 양, 돼지, 가금류, 갑각류 및 어류로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있으나, 이에 한정되지 아니한다.
- [49] 일 구체예에 있어서, 상기 동물세포는 동물의 조직으로부터 세포들을 분리시키고, 이를 생체 외에서 배양하여 만들어진 동물 유래 세포를 의미할 수 있다.
- [50] 일 구체예에 있어서, 상기 동물세포는 갑각류 세포인 것일 수 있다.
- [51] 일 구체예에 있어서, 상기 동물세포는 새우, 게 또는 랍스터 유래 세포인 것일 수 있다.
- [52] 본 명세서에서 용어 "배지 (culture media)"는 인 비트로 (in vitro)에서 줄기세포를 비롯한 세포의 성장 및 생존을 지지할 수 있게 하는 물질을 의미한다.
- [53] 본 명세서에서 용어 "기본 배지"는 세포의 배양을 위한 기본적인 성분을 포함하고 있는 배지를 의미한다. 일반적으로 기본 배지만을 사용하여 세포를 배양하는 경우, 세포가 원활하게 증식하지 않는 경우가 많아 최적의 세포증식을 위하여 다양한 성분을 첨가한다.
- [54] 일 구체예에 있어서, 상기 배지 또는 기본 배지는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM (Minimal Essential Medium), BME (Basal Medium Eagle), RPMI 1640, DMEM/F-10 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-10), DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-12), α -MEM (α -Minimal essential Medium), G-MEM (Glasgow's Minimal Essential Medium), IMDM (Isocove's Modified Dulbecco's Medium), Knockout DMEM, E8 (Essential 8 Medium), SF-DMEM (serum free-Dulbecco Modified Eagle Medium), L15 Medium 및 Grace's Insect Medium으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있으나, 이에 한정되지 아니한다.

- [55] 상기 배지 이외에 당해 업계에서 이용되는 배지이면 충분하며, 상기 배지는 아미노산류, 비타민류, 무기염류 및 기타 성분을 포함할 수 있다. 예를 들면, 비필수 아미노산 및 L-글루타민, 비타민류로는 비타민 B12, 무기염류로는 트레이스 성분($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, ZnSO_4), 포스포에놀 피루베이트(Phosphoenol pyruvate), 모노에탄올아민(Monoethanolamine), 소듐 셀레니트(Sodium selenite) 및 소듐 바이카보네이트(Sodium bicarbonate), 기타 성분으로는 D-글루코스, 리놀레익산(Linoleic acid), 리포익산(Lipoic acid), 소듐 피루베이트(Sodium pyruvate), 하이폭산틴 나트륨(Hypoxanthine Na), 푸트레신 하이드로클로라이드(Putrescine HCl) 및 폴리아민 용액(Polyamine solution)을 포함할 수 있다.
- [56] 일 구체예에 있어서, 상기 배지는 무혈청 배지인 것일 수 있다.
- [57] 일 구체예에 있어서, 상기 동물세포 배양용 배지 조성물은 혈청을 포함하지 않는 것일 수 있다.
- [58] 무혈청 배지는 비윤리적, 비환경적, 고비용 문제점을 가진 혈청을 사용하지 않는 세포배양용 배지로 혈청의 사용을 불필요하게 한 세포배양용 배지를 의미한다.
- [59] 일 구체예에 있어서, 상기 배지는 혈청을 포함하는 배지인 것일 수 있다.
- [60] 상기 혈청은 동물 혈액일 수 있으나 이에 한정되지 아니하고, 바람직하게는 포유동물(예: 돼지, 말, 소, 염소, 양 및 개) 혈액으로부터 유래된 혈청이며, 더욱 바람직하게는 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS)일 수 있다.
- [61] 일 구체예에 있어서, 상기 혈청은 소태아 혈청(Fetal bovine serum, FBS), 사람 혈소판 용해물(human platelet lysate, hPL), 사람 혈청 알부민(human serum albumin, HSA), 사람 혈청(human Serum, HS), 혈소판 혈장(Platelet-Rich Plasma, PRP), 혈소판 부족 혈장(platelet poor plasma, PPP) 송아지 혈청(Calf serum), 말 혈청(horse serum), 돼지 혈청(porcine serum) 및 양 혈청(sheep serum)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [62] 일 구체예에 있어서, 상기 배양은 부유배양인 것일 수 있다.
- [63] 본 명세서에서 용어 "세포 배양 (cell culture)"은 조절된 조건 하에서 인공적으로 체외에서 살아있는 세포를 키우는 과정을 의미한다. 또한, 개체 조직의 일부분을 무균적으로 떼어내 효소로 세포간 연결 물질을 분해하여 유리시킨 현탁액을 병이나 페트리 접시와 같은 배양 접시의 편평한 밑부분에 도말하여 세포를 성장 및 증식시키는 것일 수 있다.
- [64] 본 명세서에서 용어 "부유배양(suspension culture)"은 배양대상의 세포를 기질(substrate) 등에 고정시키지 않은 채로 배양액 내에서 부유(floating)하는 상태로 배양하는 것을 말한다.
- [65] 상기 배양 과정에서 배양세포의 부유상태를 만들기 위해 배지에 SR(serum replacement)를 첨가하거나, 저부착 배양 접시 또는 바이오리액터를 사용하여 배양할 수 있으나, 이에 한정되지 않고 당업계에서 사용되는 다양한 부유배양 방법을 사용할 수 있다.

- [66] 상기 배양은 성장 및 증식인 것일 수 있다.
- [67] 본 명세서에서 용어 "성장(growth) 및 증식(proliferation)"은, 세포 수의 증가를 의미한다. 상기 배양은 미분화 증식인 것일 수 있다. 상기 미분화 증식(undifferentiated proliferation)은 줄기세포가 특정 세포로 분화되지 않은 채 원래의 세포와 동일한 성질을 가지는 즉, 분화능(potency) 및 자기재생(self-renewal)능을 가지는 세포로 증식하는 것을 의미한다. 본 명세서에서 용어 "분화(differentiation)"는 세포가 분열 증식하여 성장하는 동안에 서로 구조나 기능이 특수화되는 현상, 즉 생물의 세포, 조직 등이 각각에게 주어진 일을 수행하기 위하여 형태나 기능이 변해가는 것을 의미한다. 특정 세포 유형으로의 분화 정도를 측정 또는 판단하는 것은 당해 분야에 익히 공지된 방법에 의해 수행될 수 있다. 또 한, 상기 분화는, 유세포 분석 또는 면역세포화학과 같은 기법을 사용하여 세포 표면 표지 (예를 들면, 조직-특이적 또는 세포-표지 특이적 항체로 세포를 염색함) 및 세포 형태의 변화 (예를 들면, 핵 비율/세포질 비율)를 측정하면서, 광학 현미경 또는 공초점 현미경을 사용하여 세포 형태를 조사함으로써, 또는 중합효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction: PCR) 및 유전자-발현 프로파일과 같은 당해 분야에 익히 공지된 기법을 사용하여 유전자 발현상의 변화를 측정함으로써 확인될 수 있다.
- [68] 일 구체예에 있어서, 상기 배지 조성물은 아미노산 혼합물 또는 미량원소를 추가로 포함할 수 있다.
- [69] 상기 아미노산 혼합물에 포함되는 아미노산의 종류에는 제한이 없으며 알라닌, 시스테인, 아스파르트산, 글루탐산, 페닐알라닌, 글라이신, 히스티딘, 아이소류신, 라이신, 류신, 메티오닌, 아스파라긴, 피롤라이신, 프롤린, 글루타민, 아르기닌, 세린, 트레오닌, 셀레노시스테인, 발린, 트립토판, 타이로신 중 하나 이상의 것일 수 있다.
- [70] 상기 아미노산 혼합물은 세린, 아스파르트산, 글루탐산, 알라닌, 글루타민, 프롤린, 타이로신, 발린 및 류신으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것일 수 있다.
- [71] 일 구체예에 있어서, 상기 배지 조성물은 아미노산 혼합물을 100 내지 5000 mg/L, 100 내지 4500 mg/L, 100 내지 4000 mg/L, 100 내지 3500 mg/L, 500 내지 5000 mg/L, 1000 내지 5000 mg/L, 1500 내지 5000 mg/L, 2000 내지 5000 mg/L, 2500 내지 5000 mg/L, 500 내지 4500 mg/L, 1000 내지 4000 mg/L, 1500 내지 3500 mg/L 또는 2000 내지 3000 mg/L 농도로 포함할 수 있다.
- [72] 본 명세서에 사용된 아미노산의 일문자(삼문자)는 생화학 분야에서의 표준 약어 규정에 따라 다음의 아미노산을 의미한다: A(Ala): 알라닌; C(Cys): 시스테인; D(Asp): 아스파르트산; E(Glu): 글루탐산; F(Phe): 페닐알라닌; G(Gly): 글라이신; H(His): 히스티딘; I(Ile): 이소류신; K(Lys): 라이신; L(Leu): 류신; M(Met): 메티오닌; N(Asn): 아스파라긴; O(Ply): 피롤라이신; P(Pro): 프롤린; Q(Gln): 글루타

- 민; R(Arg): 아르지닌; S(Ser): 세린; T(Thr): 쓰레오닌; U(Sec): 셀레노시스테인, V(Val): 발린; W(Trp): 트립토판; Y(Tyr): 타이로신.
- [73] 상기 미량원소는 생물이 성장하는 데 꼭 필요한 물질들 중 아주 작은 양만 필요한 물질들을 의미하며, 생물의 성장 발달 및 생리에 중요한 역할을 하는 필수 화학 원소이다.
- [74] 일 구체예에 있어서, 상기 미량원소는 칼슘(Ca), 칼륨 (K), 나트륨 (Na), 철(Fe), 염소(Cl), 붕소(B), 망간(Mn), 아연(Zn), 구리(Cu) 및 몰리브덴(Mo)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 것일 수 있다.
- [75] 일 구체예에 있어서, 상기 배지 조성물은 미량원소를 10 내지 500 mg/L, 10 내지 450 mg/L, 10 내지 400 mg/L, 10 내지 350 mg/L, 50 내지 500 mg/L, 100 내지 500 mg/L, 150 내지 500 mg/L, 200 내지 500 mg/L, 250 내지 500 mg/L, 50 내지 450 mg/L, 100 내지 400 mg/L, 150 내지 350 mg/L 또는 200 내지 300 mg/L 농도로 포함할 수 있다.
- [76] 일 구체예에 있어서, 상기 배지 조성물은 상기 아미노산 혼합물 또는 미량원소를 100 내지 5000 mg/L, 100 내지 4500 mg/L, 100 내지 4000 mg/L, 100 내지 3500 mg/L, 500 내지 5000 mg/L, 1000 내지 5000 mg/L, 1500 내지 5000 mg/L, 2000 내지 5000 mg/L, 2500 내지 5000 mg/L, 500 내지 4500 mg/L, 1000 내지 4000 mg/L, 1500 내지 3500 mg/L 또는 2000 내지 3000 mg/L로 포함하는 것일 수 있다.
- [77] 일 구체예에 있어서, 상기 기본 배지는 비오틴(Biotin), D-칼슘 판토텐네이트(D-Ca pantothenate), 알파-케토글루타르산(α -ketoglutaric acid), 염화 콜린(choline chloride), 엽산(Folic acid), i-이노시톨(i-inositol), 니코틴산(nicotinic acid), 피리독신-HCl(pyridoxine-HCl), 리보플라빈(Riboflavin), 티아민-HCl(Thiamine-HCl) 및 펜타-아미노 벤조산(penta-Amino benzoic acid)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 비타민을 포함하지 않는 것일 수 있다.
- [78] 일 구체예에 있어서, 상기 기본 배지는 비타민을 포함하지 않는 것일 수 있다.
- [79] 일 구체예에 있어서, 상기 기본 배지는 푸마르산(Fumaric acid), 말산(Malic acid) 및 석신산(Succinic acid)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 유기산을 포함하지 않는 것일 수 있다.
- [80] 일 구체예에 있어서, 상기 기본 배지는 유기산을 포함하지 않는 것일 수 있다.
- [81] 비타민과 유기산의 경우 세포에 지나치게 많은 양을 처리할 경우 오히려 세포 증식을 저해하는 결과를 초래할 수 있다.
- [82]
- [83] 또 다른 양상은 비-인간 동물로부터 세포를 분리하는 단계; 및 상기 분리된 세포를 현탁배양하는 단계를 포함하는, 세포주의 제조방법을 제공한다.
- [84] 일 구체예에 있어서, 상기 세포주의 제조방법은 생물학적 또는 화학적 외인성 불멸화 인자를 처리하는 단계를 포함하지 않는 것일 수 있다. 또는 상기 세포주의 제조방법은 생물학적 또는 화학적 외인성 인자를 처리하여 세포의 불멸화를 유도하는 단계를 포함하지 않는 것일 수 있다.

- [85] 상기 생물학적 외인성 불멸화 인자 또는 생물학적 외인성 인자는 근육 특이적 및/또는 지방 특이적 성장 유전자가 통합된 벡터일 수 있다.
- [86] 예를 들어, 상기 유전자는 MyoD, SMARCD3, Pax3, Pax7, 미오신(myosin)-1, 인테그린(integrin) 알파-7, 카드헤린(cadherin)-15, 미오게닌(myogenin), 성장 호르몬, 인슐린 유사 성장 인자(insulin-like growth factor), 미오스타틴(myostatin), 성장 분화 인자(growth differentiation factor), 갑각류 혈당상승 호르몬(hyperglycemic hormone) 또는 미오신 중쇄 유전자일 수 있다.
- [87] 상기 벡터는 아데노바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터일 수 있다.
- [88] 또한, 상기 생물학적 외인성 불멸화 인자 또는 생물학적 외인성 인자는 재프로그래밍 마이크로 RNA 및 mRNA일 수 있다.
- [89] 상기 재프로그래밍 마이크로 RNA는 mir302a-d, mir367, Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc 또는 Lin28일 수 있다.
- [90] 상기 화학적 외인성 불멸화 인자 또는 화학적 외인성 인자는 텔로머레이스 활성화제일 수 있다.
- [91] 상기 화학적 외인성 불멸화 인자 또는 화학적 외인성 인자는 사이클로아스트라제놀(Cycloastragenol), 글리신 맥스(Glycine Max)(대두)로부터의 제니스테인(Genistein) 또는 레스베라트롤(Resveratrol)일 수 있다.
- [92] 일 구체예에 있어서, 상기 세포주의 제조방법은 알부민 또는 외인성 알부민을 처리하는 단계를 포함하지 않는 것일 수 있다.
- [93] 일 구체예에 있어서, 상기 세포는 근육줄기세포, 근육세포 및 이의 전구세포(progenitor)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다.
- [94] 상기 근육줄기세포는 위성 세포(satellite cell) 또는 근아세포(myoblast), 예를 들어, 근아세포일 수 있으나, 이에 한정되지 아니한다.
- [95] 상기 근육줄기세포는 상기한 바와 같다.
- [96] 상기 근육줄기세포는 근모세포(myoblast)로 유도되는 과정에서 Pax7 또는 MyoD의 발현을 보이는 세포일 수 있다.
- [97] 상기 근모세포는 상기한 바와 같다.
- [98] 상기 근육세포는 상기한 바와 같다.
- [99] 상기 근육세포는 근세포(myocyte) 또는 근관세포(myotube), 예를 들어, 근세포일 수 있으나, 이에 한정되지 아니한다.
- [100] 상기 전구세포는 복수 계통으로 분화된 세포를 생성시킬 수 있는 세포, 예컨대, 근아세포, 섬유아세포, 지방세포, 간질 세포, 주피세포, 평활근 세포 및 내피 세포를 지칭한다. 전구세포는 이들이 전형적으로 광범위한 자기 복제 능력을 갖지 않는다는 점에서 줄기 세포와는 상이하다.
- [101] 상기 세포는 지방 세포(fat cell 또는 adipocyte) 및/또는 이의 전구 세포, 간질 세포(결합조직) 및/또는 이의 전구 세포, 또는 내피 세포(혈관) 및/또는 이의 전구 세포를 더 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 아니한다.

- [102] 일 구체예에 있어서, 상기 비-인간 동물은 소, 양, 돼지, 가금류, 갑각류 또는 어류일 수 있다.
- [103] 일 구체예에 있어서, 상기 갑각류는 새우, 게 또는 랍스터 일 수 있다.
- [104] 일 구체예에 있어서, 상기 현탁배양은 100 내지 1000 RPM, 100 내지 900 RPM, 100 내지 800 RPM, 100 내지 700 RPM, 100 내지 600 RPM, 100 내지 500 RPM, 100 내지 400 RPM, 100 내지 300 RPM, 200 내지 1000 RPM, 300 내지 1000 RPM, 200 내지 900 RPM, 200 내지 800 RPM, 200 내지 700 RPM, 200 내지 600 RPM, 200 내지 500 RPM, 200 내지 400 RPM, 250 RPM 또는 300 RPM에서 수행되는 것일 수 있다.
- [105] 일 구체예에 있어서, 상기 현탁배양은 1일 내지 42일간, 1일 내지 35일간, 1일 내지 28일간, 7일 내지 42일간, 14일 내지 42일간, 21일 내지 42일간, 7일 내지 35일간, 14일 내지 28일간, 21일 내지 28일간 또는 28일간 수행되는 것일 수 있다.
- [106] 일 구체예에 있어서, 상기 현탁배양은 10 내지 50°C 10 내지 40°C 10 내지 30°C 20 내지 50°C 25 내지 50°C 20 내지 40°C 25 내지 30°C 또는 28°C에서 수행되는 것일 수 있다.
- [107] 일 구체예에 있어서, 상기 현탁배양은 무혈청 배지에서 수행되는 것일 수 있다.
- [108] 일 구체예에 있어서, 상기 현탁배양은 혈청을 포함하는 배지에서 수행되는 것일 수 있다.
- [109] 본 명세서에서 용어 "현탁배양(suspension culture)"은 배양대상의 세포를 기질(substrate) 등에 고정시키지 않은 채로 배양액 내에서 부유(floating)하는 상태로 배양하는 것을 말한다.
- [110] 본 명세서에서 용어 "현탁배양"과 "부유배양"은 동의어이다.
- [111] 본 명세서에서 용어 "정착배양"과 "부착배양"은 동의어이다.
- [112] 상기 배양 과정에서 배양세포의 부유상태를 만들기 위해 배지에 SR(serum replacement)를 첨가하거나, 저부착 배양 접시 또는 바이오리액터를 사용하여 배양할 수 있으나, 이에 제한되지 않고 당업계에서 사용되는 다양한 부유배양 방법을 사용할 수 있다.
- [113] 상기 배양은 성장 및 증식인 것일 수 있다.
- [114] 상기 성장 및 증식은 상기한 바와 같다.
- [115] 일 구체예에 있어서, 상기 배지는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM (Minimal Essential Medium), BME (Basal Medium Eagle), RPMI 1640, DMEM/F-10 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-10), DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-12), α -MEM (α -Minimal essential Medium), G-MEM (Glasgow's Minimal Essential Medium), IMDM (Isocove's Modified Dulbecco's Medium), Knockout DMEM, E8 (Essential 8 Medium), SF-DMEM (serum free-Dulbecco Modified Eagle Medium), L15 Medium 및 Grace's Insect Medium으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있으나, 이에 한정되지 아니한다.

- [116] 상기 배지 이외에 당해 업계에서 이용되는 배지이면 충분하며, 상기 배지는 아미노산류, 비타민류, 무기염류 및 기타 성분을 포함할 수 있다. 예를 들면, 비필수 아미노산 및 L-글루타민, 비타민류로는 비타민 B12, 무기염류로는 트레이스 성분($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, ZnSO_4), 포스포에놀 피루베이트(Phosphoenol pyruvate), 모노에탄올아민(Monoethanolamine), 소듐 셀레니트(Sodium selenite) 및 소듐 바이카보네이트(Sodium bicarbonate), 기타 성분으로는 D-글루코스, 리놀레익산(Linoleic acid), 리포익산(Lipoic acid), 소듐 피루베이트(Sodium pyruvate), 하이폭산틴 나트륨(Hypoxanthine Na), 푸트레신 하이드로클로라이드(Putrescine HCl) 및 폴리아민 용액(Polyamine solution)을 포함할 수 있다.
- [117] 일 구체예에 있어서, 상기 배지는 무혈청 배지인 것일 수 있다.
- [118] 무혈청 배지는 비윤리적, 비환경적, 고비용 문제점을 가진 혈청을 사용하지 않는 세포배양용 배지로 혈청의 사용을 불필요하게 한 세포배양용 배지를 의미한다.
- [119] 다른 양상은 비-인간 동물로부터 세포를 분리하는 단계; 및 상기 분리된 세포를 현탁배양하는 단계를 포함하는, 세포주의 제조방법에 따라 제조된 세포주를 제공한다.
- [120] 일 구체예에 있어서, 상기 세포주는 -200 내지 -75°C 에서 1 내지 12개월 동안 세포 증식능이 유지되는 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [121] 다른 양상은 상기 세포주의 제조방법에 따라 제조된 세포주를 증식시키기 위한 현탁배양을 수행하는 단계를 포함하는 세포주의 배양방법을 제공한다.
- [122] 상기 세포주를 증식시키기 위한 현탁배양이 수행될 수 있는 RPM 및 온도는 상기 기재한 바와 같다.
- [123] 일 구체예에 있어서, 상기 세포주를 증식시키기 위한 현탁배양은 혈청을 포함하는 배지에서 수행되는 것일 수 있다.
- [124] 상기 혈청은 동물 혈액일 수 있으나 이에 한정되지 아니하고, 바람직하게는 포유동물(예: 돼지, 말, 소, 염소, 양 및 개) 혈액으로부터 유래된 혈청이며, 더욱 바람직하게는 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS)일 수 있다.
- [125] 일 구체예에 있어서, 상기 혈청은 우태아 혈청(Fetal bovine serum, FBS), 사람 혈소판 용해물(human platelet lysate, hPL), 사람 혈청 알부민(human serum albumin, HSA), 사람 혈청(human Serum, HS), 혈소판 혈장(Platelet-Rich Plasma, PRP), 혈소판 부족 혈장(platelet poor plasma, PPP) 송아지 혈청(Calf serum), 말 혈청(horse serum), 돼지 혈청(porcine serum) 및 양 혈청(sheep serum)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [126] 일 구체예에 있어서, 상기 혈청은 배지 총 중량을 기준으로 1 내지 20 중량%, 3 내지 18 중량%, 5 내지 16 중량%, 7 내지 14 중량%, 9 내지 12 중량% 또는 10 중량%로 포함될 수 있다.

- [127] 또 다른 양상은 비-인간 동물로부터 세포를 분리하는 단계; 및 상기 분리된 세포를 현탁배양하는 단계를 포함하는, 세포주의 제조방법에 따라 제조된 세포주를 포함하는 배양육을 제공한다.
- [128] 본 발명에서 상기 용어 "배양육"은 클린육(clean meat) 또는 세포 기반 육(cell-based meat) 또는 재배육(cultivated meat)이라고도 하며, 인간 또는 비-인간 동물이 먹기에 적합하거나 식용가능한 것을 의미한다.
- [129] 일 구체예에서, 상기 배양육을 포함하는 식품 조성물을 제공한다.
- [130] 상기 식품은 스낵류, 만두류, 튀김류, 볶음류, 찜류, 장류, 조미료, 파우더믹스류, 빵류, 가공통조림류, 음료, 건해조류, 가공면류 및 가공 식품으로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상인 것일 수 있다.
- [131] 상기 배양육이 식품에 첨가되는 형태는 식품에 사용되는 목적에 따라 다양한 입자 크기로 분쇄된 형태일 수 있다. 1 μ m 내지 10 cm의 범위에서 균일 또는 불균일하게 분쇄되어 식품에 첨가될 수 있다. 또는 식품에 사용되는 목적에 따라 건조된 파우더 형태로 첨가될 수 있다.
- [132] 상기 식품 조성물은 지방 및/또는 착색제를 더 포함할 수 있다. 상기 지방은 배양육 제조시에 함께 지방 세포로 주입되어 근육 세포의 증식 과정에서 공동배양(co-culture)하는 방식으로 포함될 수 있다.
- [133] 또는 액상형태의 지방을 첨가하는 방식으로 포함될 수 있다. 이 경우 육류에 포함된 포화 지방산 대신 유익한 지방으로 대체할 수 있어 건강에 좋을 수 있다.
- [134] 일 구체예에 있어서, 지방은 대두유, 옥수수기름, 카놀라유, 미강유, 참기름, 추출참깨유, 들기름, 추출들깨유, 홍화유, 해바라기유, 목화씨기름, 땅콩기름, 올리브유, 팜유류, 야자류, 고추씨기름 등 식물성 유지류, 식용우지, 식용돈지, 원료우지, 원료돈지, 어유 등 동물성 유지류, 및 혼합식용유, 향미유, 가공우지, 쇼트닝, 마가린, 모조치즈, 식물성크림 등 식용유지가공품을 사용할 수 있다.
- [135] 착색제는 식품에 색을 부여하는 화합물을 지칭하는데, 소고기 또는 돼지고기의 붉은 육색을 재현하기 위하여 인공 착색제, 천연 착색제, 천연 추출물 (예를 들어, 비트 루트(beet root) 추출물, 석류 열매 추출물, 체리 추출물, 당근 추출물, 적양배추 추출물, 홍조류(red seaweed) 추출물), 개질된 천연 추출물, 천연 즙 (예를 들어, 비트 루트 즙, 석류즙, 체리즙, 당근즙, 적양배추즙, 홍조류즙), 개질된 천연 즙, FD&C (Food Drug & Cosmetics) 적색 3호 (에리스로신), FD&C 녹색 3호 (패스트 그린(fast green) FCF), FD&C 적색 40호 (알루라레드(allura red) AC), FD&C 황색 5호 (타르타진(tartazine)), FD&C 황색 6호 (선셋 옐로(sunset yellow) FCF), FD&C 청색 1호 (브릴리언트 블루(brilliant blue) FCF), FD&C 청색 2호 (인디고틴(indigotine)), 산화티타늄, 아나토(annatto), 안토시아닌, 베타닌, 베타-APE 8 카로티날, 베타-카로틴, 블랙 커런트(black currant), 번트 슈가(burnt sugar), 칸타잔틴, 캐러멜, 카민/카민산, 코치닐 추출물, 커큐민, 루테인, 카로티노이드, 모나신(monascin), 파프리카, 리보플라빈, 사프란(saffron), 강황(turmeric), 및 이들의 조합을 사용할 수 있지만, 이에 특별히 제한되지 않는다. 추가적으로 아질산염과

같은 발색제 및 상기 아질산염의 발색을 촉진하는 아스코르브산, 에리소브르산 또는 이들의 염을 발색 보조제로 더 첨가할 수 있다.

- [136] 또한 추가적으로 지방의 산패, 색상 변화 또는 지방의 분리 등을 방지하기 위하여 단백질을 안정하기 위한 산화방지제, 유화제 염류 등을 첨가할 수 있다. 상기 산화방지제, 유화제 염류 등은 당업계에서 널리 이용되는 것이면 제한되지 않고 사용 가능하다.

발명의 효과

- [137] 일 양상에 따른 효모 추출물 또는 펩톤(Peptide)을 포함하는 동물세포 배양용 배지 조성물에 의하면, 혈청을 포함하지 않는 배지에서도 동물세포의 성장과 증식이 가능하고, 동물세포의 성장 및 증식이 촉진되는 효과가 있고, 일 양상에 따른 기본 배지 및 효모 추출물을 포함하는 동물세포 배양용 배지 조성물에 의하면, 비타민 및 유기산을 포함하지 않는 기본 배지에서도 세포를 효과적으로 증식시킬 수 있고, 배양액 성분을 최소화하여 세포 배양액의 가격을 절감할 수 있는 효과가 있으며, 일 양상에 따른 비-인간 동물로부터 세포를 분리하는 단계; 및 상기 분리된 세포를 현탁배양하는 단계를 포함하는, 세포주의 제조방법에 의하면, 비-인간 동물로부터 효과적으로 세포주를 수득할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [138] 도 1은 동물세포 배양 시 배양 배지를 달리한 경우에 따른 세포 증식의 차이를 확인한 결과이다.
- [139] 도 2 내지 도 4는 펩톤을 포함하는 배지에서 동물세포를 배양하여 우태아혈청을 첨가하거나 첨가하지 않은 배지와 비교하여 동물세포의 증식의 차이를 확인한 결과이다.
- [140] 도 5 내지 도 7은 효모 추출물을 포함하는 배지에서 동물세포를 배양하여 우태아혈청을 첨가하거나 첨가하지 않은 배지와 비교하여 동물세포의 증식의 차이를 확인한 결과이다.
- [141] 도 8은 효모 추출물을 포함하는 배지에서 동물세포를 배양하는 경우, 시간경과에 따른 아미노산의 소모량을 측정한 경과이다.
- [142] 도 9 내지 도 14는 효모 추출물 또는 펩톤을 포함하는 배지에 아미노산 혼합물을 추가로 첨가하여 동물세포의 증식을 관찰한 결과이다.
- [143] 도 15 내지 도 20은 효모 추출물 또는 펩톤을 포함하는 배지에 미량원소를 추가로 첨가하여 동물세포의 증식을 관찰한 결과이다.
- [144] 도 21은 기본배지의 비타민 포함 유무에 따른 세포 증식의 차이를 확인한 결과이다.
- [145] 도 22는 기본배지의 유기산 포함 유무에 따른 세포 증식의 차이를 확인한 결과이다.
- [146] 도 23은 기본배지의 비타민 및 유기산 포함 유무에 따른 세포 증식의 차이를 확인한 결과이다.

- [147] 도 24 및 도 25는 갑각류로부터 세포주를 확립하는 과정을 나타내는 모식도이다.
- [148] 도 26은 갑각류로부터 분리한 세포를 배양하며 현미경으로 관찰한 결과이다.
- [149] 도 27 내지 도 29는 갑각류로부터 분리한 세포를 배양 조건을 달리하여 배양하며 세포의 증식을 확인한 결과이다.
- [150] 도 30은 갑각류로부터 분리한 세포가 세포주로서 확립되어 장기간의 배양에도 지속적인 증식능을 갖는 것을 확인한 결과이다.
- [151] 도 31은 갑각류로부터 분리한 세포가 세포주로서 확립되어 장기간의 보관 후에도 지속적인 증식능을 갖는 것을 확인한 결과이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [152] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [153] 본 발명의 명세서 및 청구범위에 사용된 용어 또는 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정 해석되지 아니하며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다.
- [154] 본 발명의 명세서 전체에 있어서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 "포함" 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [155] 본 발명의 명세서 전체에 있어서, "A 및/또는 B"는, A 또는 B, 또는 A 및 B를 의미한다.

[156]

[157] 실시예 1. 배지 별 세포 증식 확인

- [158] 세포 배양 시 배양 배지를 달리한 경우에 세포 증식에 차이가 나타나는지 알아보기 위하여 새우에서 분리한 갑각류 유래 세포를 일반적으로 사용되는 기본 배지(DMEM-F12, L15 또는 Grace's insect media)에 0, 5 또는 10% (v/v) 우태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS)을 첨가한 배지를 사용하여 배양하고 세포 증식 정도를 확인하였다.
- [159] 구체적으로, 28 내지 32°C 300rpm 조건에서 최초 1.5×10^5 cells/ml로 갑각류 세포를 접종하고 48시간 동안 부유배양(Suspension Culture)하였으며, 3가지 기본 배지에서 세포의 증식을 비교하였다. 대략적인 세포의 증식 경향을 확인하기 위하여 OD600에서 흡광도를 측정하였으며, 배양된 정확한 세포 수를 hemocytometer를 통해 확인하였다. 그 결과를 도 1에 나타내었다.
- [160] 도 1에 나타난 바와 같이, 흡광도 측정 결과 및 hemocytometer를 통한 세포 수 확인 결과, Grace's insect media에서 가장 높은 세포 증식을 확인하였다. 또한, 우태아혈청을 첨가하지 않은 배양 배지보다 우태아혈청을 첨가한 배지에서 높은 세

포 증식을 보였다. 상기 결과로부터 동일하게 우태아혈청을 포함하더라도 기본 배지의 종류에 따라 갑각류 세포의 증식률은 확연히 달라진다는 것을 확인할 수 있었으며, Grace's insect media가 갑각류 세포의 증식에 적합하지만 다른 기본 배양 배지에 우태아혈청을 첨가하더라도 세포의 증식은 발생한다는 것을 알 수 있었다.

[161]

[162] 실시예 2. Peptone 포함 배지에서의 세포 증식

[163] 동물세포의 배양에 있어서 세포 증식 효과가 있는 우태아혈청을 대체할 수 있는 성분으로 펩톤(Peptide)이 사용될 수 있는 지 여부를 확인하기 위해, 일반적인 동물세포 배양에 사용하지 않는 펩톤에 의한 세포 증식 효과를 확인하였다. 펩톤은 각종 단백질을 효소 분해하거나 가수 분해할 때 생성되는 생성물의 총칭으로 폴리펩티드, 아미노산, 미네랄 등의 성분이 혼합되어 있다. 구체적으로, 기본 배지 3종류(DMEM-F12, L15 또는 Grace's insect media)에 0.01, 0.6, 1 또는 10% (w/v)의 농도가 되도록 펩톤을 첨가하여 배양액을 제조하고, 우태아혈청을 첨가하거나 첨가하지 않은 배양액과 비교하여 새우, 게 또는 랍스터에서 분리한 갑각류 유래 세포의 증식을 실시예 1과 같은 방법으로 확인하였다. 그 결과를 도 2 내지 도 4에 나타내었다.

[164] 도 2 내지 도 4에 나타낸 바와 같이, DMEM-F12, L15 또는 Grace's insect media에 우태아혈청과 펩톤을 첨가하지 않았을 경우 매우 미미한 세포의 증식을 확인하였다. 하지만, 3종류의 기본 배지에 펩톤을 첨가하여 세포를 배양한 경우 10% (v/v)의 우태아혈청을 포함하는 경우보다 높은 세포 증식률을 보였으며, 그 중에서도 Grace's insect media에 펩톤을 첨가한 경우 가장 높은 세포 증식을 보이는 것을 확인하였다. 또한, 모든 기본 배지에 펩톤을 첨가하여 배양하였을 경우 10% (v/v) 우태아혈청을 첨가한 배양 배지보다 세포 증식률이 증가하므로 펩톤이 우태아혈청보다 세포 증식에 효과적인 것을 확인하였다.

[165]

[166] 실시예 3. 효모 추출물 포함 배지에서의 세포 증식

[167] 동물세포의 배양에 있어서 세포 증식 효과가 있는 우태아혈청을 대체할 수 있는 성분으로 효모 추출물(Yeast extract)이 사용될 수 있는 지 여부를 확인하기 위해, 효모 추출물을 첨가하였을 경우 어떠한 세포 증식의 변화를 보이는지 확인하였다. 펩톤 대신에 효모 추출물을 사용한 것을 제외하고는 실시예 2와 동일한 방법을 통해 확인하였다. 그 결과를 도 5 내지 도 7에 나타내었다.

[168] 도 5 내지 도 7에 나타낸 바와 같이, Grace's insect media를 기본 배지로 사용하고 효모 추출물을 첨가한 경우 가장 높은 세포 증식률을 보였다. 상기 결과로부터 배지에 효모 추출물을 첨가할 경우 우태아혈청을 첨가한 배지 보다 세포 증식에 효과적이라는 것을 확인하였다.

[169]

- [170] 실시예 4. 세포 배양 시 아미노산 소모량의 측정 및 아미노산 혼합물 첨가 배지에서의 세포 증식
- [171] **4.1. 아미노산 소모량의 측정**
- [172] Grace's insect media에 효모 추출물을 첨가한 배양액이 세포 증식에 효과적인 것을 확인하고, 세포 증식 속도를 더욱 증가시킬 수 있는 방법을 알아보기 위해 세포의 배양 과정에서 아미노산의 소모량을 ultra performance liquid chromatography (UPCL)를 통해 측정하였다. 구체적으로, Grace's insect media에 0.6% (w/v) 효모 추출물을 첨가한 배양 배지에 새우 세포를 배양한 뒤, 세포 배양 후 3, 6, 10, 12, 24 및 48시간의 배양액을 채취하여 아미노산 소모량을 측정하였다. 그 결과를 도 8에 나타내었다.
- [173] 도 8에 나타낸 바와 같이, Serine, Aspartic acid, glutamic acid, alanine, glutamine, proline, tyrosine, valine, leucine, 총 9종의 아미노산이 12시간 이내에 50% 이상 소모되는 것을 확인하였다.
- [174]
- [175] **4.2. 아미노산 혼합물 첨가 배지에서의 세포 증식**
- [176] 12시간 이내에 50% 이상 소모되는 아미노산이 세포 증식 초기에 사용되어 세포 증식 속도에 밀접한 영향을 갖고 있을 것이라 가정하고, 효모 추출물 또는 펩톤을 첨가한 Grace's insect media에 먼저 소모되는 9종의 아미노산 혼합물을 추가로 첨가하여 아미노산 혼합물 첨가에 의한 세포 증식을 관찰하였다. 구체적으로, Alanine 225mg/L, Aspartic Acid 350mg/L, Glutamic Acid 600mg/L, Glutamine 600mg/L, Leucine 75mg/L, Proline 350mg/L, Serin 1100mg/L, Tyrosine*2Na 75mg/L, Valine 100mg/L의 농도가 되도록 아미노산 혼합물을 첨가하고 세포 증식을 관찰하였다. 그 결과를 도 9 내지 도 14에 나타내었다.
- [177] 도 9 내지 도 14에 나타낸 바와 같이, 세포 배양 시작 24시간 이후에서 9종의 아미노산을 첨가하지 않은 것 보다 9종의 아미노산을 첨가한 배양 배지에서 현저히 빠른 세포 증식을 관찰할 수 있었고, 세포 배양 시작 48시간에서도 9종 아미노산을 첨가하지 않은 세포 배양 배지보다 아미노산 혼합물을 첨가한 배양 배지에서 보다 많은 양의 세포가 증식된 것을 확인할 수 있었다. 상기 결과로부터 세포 배양 시 초기 소모량이 많은 아미노산의 첨가는 세포 증식 속도 및 증식량을 증가시킨다는 것을 알 수 있었다.
- [178]
- [179] 실시예 5. 미량원소 첨가 배지에서의 세포 증식
- [180] 효모 추출물은 주로 아미노산, 비타민 그리고 미량원소(Trace element)로 구성되어 있다. 미량원소는 생물이 성장하는 데 꼭 필요한 물질들 중 아주 작은 양만 필요한 물질들을 의미하며, 생물의 성장 발달 및 생리에 중요한 역할을 하는 필수 화학 원소이다. 수은, 카드뮴, 요오드 등 대부분의 중금속 등이 이에 속한다.
- [181] 9종 아미노산 이외에 세포의 증식을 촉진시킬 수 있는 물질을 확인해보고자 효모 추출물에 포함되어 있는 미량원소의 양을 분석하여 효모 추출물 또는 펩톤을

포함하는 배양 배지에 미량원소를 추가로 첨가(Grace's insect media + yeast extract + 미량원소 또는 Grace's insect media + peptone + 미량원소)하고 세포 증식에 어떠한 영향을 미치는지 확인해보고자 세포 증식 실험을 수행하였다. 구체적으로, Calcium 5.28mg/L, Magnesium 16.2mg/L, Potassium 258mg/L, Sodium 50.4mg/L, Zinc 0.084mg/L, Copper 0.0414mg/L, Manganese 0.021mg/L의 농도로 미량원소를 첨가하고 세포증식을 관찰하였다. 그 결과를 도 15 내지 도 20에 나타내었다.

- [182] 도 15 내지 도 20에 나타낸 바와 같이, 새우 세포 배양 배지에 미량원소를 첨가한 경우 미량원소를 첨가하지 않은 대조군보다 세포 증식 속도 및 최종 증식량이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 새우 세포와 동일하게 게, 랍스터 세포 배양 배지에 미량원소를 첨가한 경우에도 미량 원소를 첨가하지 않은 대조군보다 세포 증식 속도 및 최종 증식량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 상기 결과로부터, 갑각류 세포 배양 배지에 미량원소를 첨가하면 세포 증식 속도 및 최종 증식량의 증가에 도움을 준다는 것을 확인할 수 있었다.

[183]

[184] 실시예 6. 기본 배지의 비타민 포함 유무에 따른 세포 증식

- [185] 효모 추출물(Yeast extract)은 효모의 수용성 성분들을 추출하고 수분을 제거하여 얻은 추출물로 아미노산, 펩타이드, 탄수화물, 유기산, 비타민 그리고 미네랄의 성분을 포함하고 있다. 효모 추출물의 성분과 유사하게 세포 배양 시 사용하는 기본 배지의 경우에도 아미노산, 당, 유기산, 비타민, 유기산 그리고 미네랄의 성분으로 이루어져 있어 효모 추출물과 성분은 유사하나 함량에는 차이가 있다.

- [186] 비타민을 포함하거나 포함하지 않는 기본 배지에 효모 추출물을 첨가하고 세포를 배양하여, 기본 배지에 포함되어 있는 비타민의 유무에 따라 세포 증식에 차이가 나타나는지, 기본 배지의 비타민 성분을 효모 추출물에 포함되어 있는 비타민으로 대체할 수 있는지 알아보았다.

- [187] 구체적으로, 비타민 성분을 제외한 기본 배지(Grace's insect media, 무혈청 (serum free))에 효모 추출물을 0.6% (w/v) 농도로 첨가한 배지 조성물과 기본 배지에 효모 추출물을 0.6% (w/v) 농도로 첨가한 배지 조성물을 제조하여 세포 증식을 비교하였다. 28 내지 32°C 300rpm 조건에서 최초 1.5×10^5 cells/ml로 갑각류 세포를 접종하고 48시간 동안 부유배양(Suspension Culture)하였으며, 24시간마다 세포를 취합하여 세포 증식 여부를 혈구 계산기(hemocytometer)를 통하여 확인하였다. 그 결과를 도 21에 나타내었다.

- [188] 도 21에 나타낸 바와 같이, 갑각류 세포 모두 비타민의 첨가 유무에 따라 세포 증식의 차이를 보이지 않았다. 상기 결과를 통하여, 효모 추출물에 포함된 비타민 성분만으로 갑각류 세포 증식에 효과적인 것을 확인하였으므로, 효모 추출물의 비타민 성분이 기본 배양액 (Grace's insect media)의 비타민 성분을 대체할 수 있다는 것을 실험적으로 확인하였다.

[189]

[190] 실시예 7. 기본 배지의 유기산 포함 유무에 따른 세포 증식

- [191] 유기산을 포함하거나 포함하지 않는 기본 배지에 효모 추출물을 첨가하고 세포를 배양하여, 기본 배지에 포함되어 있는 유기산의 유무에 따라 세포 증식에 차이가 나타나는지, 기본 배지의 유기산 성분을 효모 추출물에 포함되어 있는 유기산으로 대체할 수 있는지 알아보았다.
- [192] 구체적으로, 기본 배지(Grace's insect media, 무혈청(serum free))에 효모 추출물을 0.6% (w/v) 농도로 첨가한 배지 조성물과 기본 배지에서 Fumaric acid, Malic acid 및 Succinic acid를 제거하고 효모 추출물을 0.6% (w/v) 농도로 첨가한 배지 조성물에서 갑각류 세포 증식이 어떻게 변화하는지 관찰하였다. 실시예 6과 같은 방법으로 세포의 증식을 비교하였고 그 결과를 도 22에 나타내었다.
- [193] 도 22에 나타낸 바와 같이, Fumaric acid, Malic acid 및 Succinic acid를 첨가한 배지 조성물보다 첨가하지 않은 배지 조성물이 세포 증식에 효과적이라는 것을 확인할 수 있었으며, Fumaric acid, Malic acid 및 Succinic acid는 오히려 갑각류 세포 증식을 저해하는 것을 확인할 수 있었다. 상기 결과를 통해서, 효모 추출물에 포함되어 있는 유기산 성분만으로도 세포 증식에 효과적이며, 기본 배지의 성분으로 첨가되는 유기산은 오히려 세포 증식을 억제한다는 결과를 도출할 수 있었다.
- [194]
- [195] 실시예 8. 기본 배지의 비타민 및 유기산 포함 유무에 따른 세포 증식
- [196] 비타민 및 유기산을 포함하거나 포함하지 않는 기본 배지에 효모 추출물을 첨가하고 세포를 배양하여, 기본 배지에 포함되어 있는 비타민 및 유기산의 유무에 따라 세포 증식에 차이가 나타나는지, 기본 배지의 비타민 및 유기산 성분을 효모 추출물에 포함되어 있는 비타민 및 유기산으로 대체할 수 있는지 알아보았다.
- [197] 구체적으로, 기본 배지(Grace's insect media, 무혈청(serum free))에 효모 추출물을 0.6% (w/v) 농도로 첨가한 배지 조성물과 기본 배지에 비타민과 유기산을 제거하고 효모 추출물을 0.6% (w/v) 농도로 첨가한 배지 조성물을 제조하고 갑각류 세포를 배양하여 세포 증식을 확인하였다. 실시예 6과 같은 방법으로 세포의 증식을 비교하였고, 그 결과를 도 23에 나타내었다.
- [198] 도 23에 나타낸 바와 같이, 비타민과 유기산을 첨가하지 않은 배지 조성물에서 배양한 세포가 비타민과 유기산을 첨가한 배지 조성물에서 배양한 세포보다 더 빠르고 높은 증식을 보였으며, 실시예 4의 결과와 같이 유기산에 의해 세포 증식이 저해되는 것을 확인하였다.
- [199] 상기 결과들을 종합하여, 효모 추출물에 포함되어 있는 비타민이 기본 배지에 포함되어 있는 비타민을 대체할 수 있으며, 효모 추출물에 있는 유기산 외에 기본 배지에 포함되어 있는 유기산 성분이 추가된다면 세포 증식이 저해되므로, 기본 배지에 포함되어 있는 비타민과 유기산 성분을 제외하는 것이 갑각류 세포 증식에 효과적이라는 것을 확인하였다.
- [200]
- [201] 실시예 9. 새우로부터의 세포의 단리 및 세포주 확립

- [202] 살아있는 새우들을 희생시키기 전에 얼음 위에 15분간 놓아 기절시켰다. 몸체 분절들을 흐르는 수돗물에서 솔을 이용해 세척한 뒤 전해 차아염소산나트륨수(NaOCl)에서 5분간 3회 담궈 살균하였다. 멸균된 증류수를 이용해 세척한 뒤 머리와 꼬리를 제거하였다. 몸체의 분절을 꺾은 뒤 분절 사이를 핀으로 관통하여 내장을 제거한 뒤 껍질을 모두 제거하였다. 전해 차아염소산나트륨수에서 5분간 담궈 살균한 후, 멸균된 증류수로 세척하였다. 몸체 조직절편을 PBS (200 mg/L KCl, 200 mg/L KH_2PO_4 , 8000 mg/L NaCl, 2160 mg/L Na_2HPO_4 , pH7.3)로 세척 후 지방 및 표피 조직의 층을 제거하였다.
- [203] 몸체의 근육 조직을 5mm 이하 사이즈로 잘게 잘랐다. 잘게 잘린 근육 조직들을 주사기에 넣고 믹싱 튜브를 연결하였다. 믹싱 튜브 반대쪽에 28°C에서 미리 예열된 0.2% 콜라게나이즈(collagenase type II) 10mL이 들어 있는 주사기를 끼웠다. 이 물 감이 없어질 때까지 5분동안 부드럽게 섞어 주었다. 충분히 믹싱된 조직을 50 mL Conical tube에 넣어주었다. 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS)이 첨가된 배양액 10 mL을 넣어 주고 부드럽게 피펫팅하였다. 800g에서 5분간 원심분리한 뒤 상층액은 제거하고 PBS로 현탁하였다. 1000, 100, 70, 40 μm cell strainer를 이용하여 순차적으로 필터 해줌으로써 큰 덩어리 조직으로부터 세포를 분리하였다. 800g에서 5분간 원심분리한 뒤 상층액은 제거하였다.
- [204] 3% 페니실린-스트렙토마이신(Penicillin/streptomycin), 3% 젠타마이신(Gentamicin), 3% 젤셴드(ZellShield), 1.5% 네오마이신(Neomycin), 0.3% 바시트라신(Bacitracin)을 포함한 무혈청 배지 10 mL로 세포를 현탁한 뒤, 90 mL를 추가하여 500 mL 삼각플라스크에 넣어주었다. 웨이킹 인큐베이터에 넣고 300RPM으로 회전을 가해주며 28°C에서 7일간 배양하였다.
- [205] 7일 후 800g에서 5분간 원심분리한 뒤 상층액은 제거하고 PBS로 세척을 1회 하여 외식편 조직들을 제거하였다. 800g에서 5분간 원심분리한 뒤 상층액은 제거하고 3% 페니실린-스트렙토마이신, 3% 젠타마이신, 3% 젤셴드, 1.5% 네오마이신, 0.3% 바시트라신을 포함한 무혈청 배지 10 mL로 세포를 현탁한 뒤, 90 mL를 추가하여 500 mL 삼각플라스크에 넣어 웨이킹 인큐베이터에서 300RPM으로 회전을 가해주며 28°C에서 반복 배양하였다. 세포 배양 후 14일에 1.5×10^7 cells의 세포를 0.3% 바시트라신을 포함한 배지 100 mL이 들어있는 삼각플라스크로 옮겨 줌으로써 잔존하는 외식편 조직들이 희석되고 세포들만 증식되도록 하였다. 세포 밀집도가 80 내지 90%가 되면 1:3 비율로 계대해주었다. 반복 배양 후 1, 7, 14 및 21일 째에 세포를 현미경으로 관찰하였고, 그 결과를 도 26에 나타내었다. 그 결과, 세포 배양 후 7 내지 14일에 3 내지 10 μm 크기의 세포의 증식을 관찰할 수 있었다. 상기와 같이 3주간의 계대배양을 거쳐 세포주를 확립하였다. 세포들을 800g에서 5분간 원심분리한 뒤 상층액은 제거하고 1ml 셀뱅크2 동결배지(Cellbanker2)로 재 현가 하여 1×10^9 cells/mL 로 저온 튜브에 넣고 -80°C에 하룻동안 보관한 후, 그 다음날 액체질소 탱크로 옮겨주었다.

- [206] 상기 기재한 세포의 분리 및 세포주 확립 과정의 모식도를 도 24 및 도 25에 나타내었다.
- [207]
- [208] 실시예 10. 게 및 랍스터로부터의 세포의 분리 및 세포주 확립
- [209] 살아있는 게 및 랍스터들을 희생시키기 전에 얼음 위에 15분간 놓아 기절시켰다. 몸체 분절들을 흐르는 수돗물에서 솔을 이용해 세척한 뒤 전해 차아염소산나트륨수(NaOCl)에서 5 분간 3회 담궈 살균하였다. 각 개체들의 앞다리를 분리한 뒤 껍질을 제거하였다. 근육 조직을 채취하여 전해 차아염소산나트륨수에서 5 분간 담궈 살균한 후, 멸균된 증류수로 세척하였다. 앞다리 조직 절편을 PBS (200 mg/L KCl, 200 mg/L KH_2PO_4 , 8000 mg/L NaCl, 2160 mg/L Na_2HPO_4 , pH7.3)로 세척 후 근육 조직을 5mm 이하 사이즈로 잘게 잘랐다. 근육 조직을 믹싱 튜브에 넣고 0.2% 콜라게나이즈 (collagenase type II) 처리하는 과정부터는 실시예 9과 동일한 과정을 통해 세포주를 확립하였다.
- [210]
- [211] 실시예 11. 배양 조건에 따른 세포의 성장 분석
- [212] 기존에 알려진 갑각류로부터 세포를 분리하여 배양하는 방법으로는 주로 정치배양 방법이 사용되었다. 배양방법에 따라 세포의 성장에 차이가 나타나는지 알아보기 위하여, 상기 실시예 9 및 10에서 수득한 새우, 게 및 랍스터의 세포주를 이용하여 현탁배양을 실시하는 경우와 정치배양을 실시하는 경우에 있어서 세포 증식을 확인하고 비교하였다. 구체적으로, 현탁배양은 세포를 100ml 삼각플라스크에 넣고 shaking incubator (28°C/250 RPM)에서 배양하였다. 정치배양은 T75 플라스크에 세포를 넣고 incubator (28°C)에서 배양하였다. DMEM/F12, L15 또는 Grace's insect medium을 기본 배지로 사용하여, 우태아혈청인 FBS 농도를 0, 5, 10%로 첨가하여 세포 성장을 확인하였다. 세포 밀도를 1.5×10^5 cells/ml (총 10ml)로 세포를 접종하였다. 세포의 증식은 세포 배양 후 0, 24, 48시간에 흡광기를 이용하여 Optical density 600nm (OD600) 값을 측정하였으며, hemocytometer를 이용한 세포 숫자도 직접적으로 계수하여 확인하였다. 그 결과를 도 27 내지 도 29에 나타내었다.
- [213] 도 27 내지 도 29에 나타낸 바와 같이, 새우, 게 및 랍스터 세포의 48시간까지의 배양에서 시간이 지날수록 세포의 수가 증가하는 것을 OD600 및 세포 계수 결과를 통해 확인할 수 있었고, FBS의 농도가 높아질수록 세포의 증식율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.
- [214] 현탁배양과 정치배양 방법 간의 세포 성장률의 비교에 있어서, 배양 시간이 지날수록 현탁배양에서 정치배양보다 더 높은 세포 성장을 보였다. 특히 Grace's insect medium에 10% FBS가 들어간 조건에서 현탁배양을 한 경우 세포 수가 제일 높은 것으로 나타났고, 같은 조건에서 정치배양을 한 경우보다 10배 이상의 세포 수의 증가를 보였다.

- [215] 상기 결과로부터, 기본 배지의 차이에 의해서도 갑각류 세포 성장률에 차이가 발생할 수 있음을 확인하였으며, 비교한 세 가지 기본 배지 중에 Grace's insect medium에서 갑각류 세포가 제일 성장률이 높음을 확인하였다. 또한 우태아혈청이 없는 조건에서도 세포가 증식하지만 우태아혈청이 첨가되면 세포의 성장속도가 증가하는 것을 확인하였다. 더불어 기존에 알려진 정치배양 방법 보다 현탁배양 방법으로 세포를 배양하는 것이 갑각류 세포의 성장속도를 높일 수 있다는 것을 알 수 있었다.
- [216]
- [217] **실시예 12. 세포주 확립의 확인**
- [218] 새우, 게 및 랍스터로부터 분리한 세포가 지속적인 성장을 하는 세포주로 확립되었는지를 확인하였다. 구체적으로, 실시예 9 및 10와 같이 세 가지 종의 세포를 개체로부터 분리하여 3주 동안의 계대배양을 거쳐 확립한 세포(early cells)와 그 이후로 1달 동안을 더 배양 한 세포(Late cells)의 성장 곡선을 확인하였다. 세포 밀도를 1.5×10^5 cells/ml (총 10ml)로 세포를 100ml 삼각플라스크에 접종하여, 6, 24, 48, 72 및 96 시간 동안 shaking incubator(28°C250 RPM)에서 현탁배양하였다. 배양하면서 hemocytometer를 이용하여 세포 숫자를 계수하여 세포의 수를 측정하였다. 그 결과를 도 30에 나타내었다.
- [219] 도 30에 나타낸 바와 같이, early cells과 late cells 간에 세포 성장의 차이가 없는 것을 확인할 수 있었다. 또한 각 시간 별 세포들을 관측한 결과 세포 모양도 흡사한 형태를 띠고 있는 것을 확인할 수 있었다.
- [220] 확립한 세포주가 초저온(-196°C에서 장기간 보관 후에도 성장을 유지하는지를 확인하였다. 구체적으로, 액체질소에서 1, 3 및 12개월 보관된 새우, 게 및 랍스터 세포를 세포 밀도 1.5×10^5 cells/ml (총 10ml)로 100ml 삼각플라스크에 접종하여, 6, 24, 48, 72 및 96 시간 동안 shaking incubator(28°C250 RPM)에서 현탁배양하였다. 배양하면서 hemocytometer를 이용하여 세포 숫자를 계수하여 세포의 수를 측정하였다. 그 결과를 도 31에 나타내었다.
- [221] 도 31에 나타낸 바와 같이, 1, 3 및 12개월 보관된 세포간에 세포의 성장의 차이가 거의 없는 것을 확인할 수 있었다. 또한 세포 모양도 그룹간 거의 흡사한 형태를 띠고 있는 것을 확인할 수 있었다.
- [222] 상기 결과로부터, 실시예 9 및 10에 따라 수득된 새우, 게 및 랍스터의 갑각류 세포들은 오랜 기간 배양을 하더라도 그 특성의 변화 없이 지속적인 성장을 보여주며, 장기간 보관에도 세포의 성장이 유지되어 세포주로 확립된 것을 알 수 있었다.

청구범위

- [청구항 1] 효모 추출물 또는 펩톤(Peptide)을 포함하는 동물세포 배양용 배지 조성물.
- [청구항 2] 기본 배지 및 효모 추출물을 포함하는 동물세포 배양용 배지 조성물.
- [청구항 3] 제1항 또는 제2항에 있어서,
상기 효모 추출물 또는 펩톤(Peptide)을 0.01 내지 10% (w/v)로 포함하는 배지 조성물.
- [청구항 4] 제1항 또는 제2항에 있어서,
상기 동물세포는 감각류 세포인 것인 배지 조성물.
- [청구항 5] 제1항 또는 제2항에 있어서,
상기 동물세포는 새우, 게 또는 랍스터 유래 세포인 것인 배지 조성물.
- [청구항 6] 제1항 또는 제2항에 있어서,
상기 배지는 무혈청 배지인 것인 배지 조성물.
- [청구항 7] 제1항 또는 제2항에 있어서,
상기 배양은 부유배양인 것인 배지 조성물.
- [청구항 8] 제2항에 있어서,
상기 기본 배지는 비오틴(Biotin), D-칼슘 판토텐레이트(D-Ca pantothenate), 알파-케토글루타르산(α -ketoglutaric acid), 염화 콜린(choline chloride), 엽산(Folic acid), i-이노시톨(i-inositol), 니코틴산(nicotinic acid), 피리독신-HCl(pyridoxine-HCl), 리보플라빈(Riboflavin), 티아민-HCl(Thiamine-HCl) 및 펜타-아미노 벤조산(penta-Amino benzoic acid)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 비타민을 포함하지 않는 것인 배지 조성물.
- [청구항 9] 제2항에 있어서,
상기 기본 배지는 비타민을 포함하지 않는 것인 배지 조성물.
- [청구항 10] 제2항에 있어서,
상기 기본 배지는 푸마르산(Fumaric acid), 말산(Malic acid) 및 석신산(Succinic acid)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 유기산을 포함하지 않는 것인 배지 조성물.
- [청구항 11] 제2항에 있어서,
상기 기본 배지는 유기산을 포함하지 않는 것인 배지 조성물.
- [청구항 12] 효모 추출물 또는 펩톤(Peptide)을 포함하는 동물세포 배양용 배지 조성물에서 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 동물세포의 배양 방법.
- [청구항 13] 기본 배지 및 효모 추출물을 포함하는 동물세포 배양용 배지 조성물에서 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 동물세포의 배양 방법.
- [청구항 14] 비-인간 동물로부터 세포를 분리하는 단계; 및
상기 분리된 세포를 현탁배양하는 단계

- 를 포함하는, 세포주의 제조방법.
- [청구항 15] 제14항에 있어서,
상기 비-인간 동물은 소, 양, 돼지, 가금류, 갑각류 또는 어류인 것인 방법.
- [청구항 16] 제15항에 있어서,
상기 갑각류는 새우, 게 또는 랍스터인 것인 방법.
- [청구항 17] 제14항에 있어서,
상기 현탁배양은 1일 내지 42일간 수행되는 것인 방법.
- [청구항 18] 비-인간 동물로부터 세포를 분리하는 단계; 및
상기 분리된 세포를 현탁배양하는 단계
를 포함하는, 세포주의 제조방법에 따라 제조된 세포주.
- [청구항 19] 제18항의 세포주를 증식시키기 위한 현탁배양을 수행하는 단계를 포함하
는 세포주의 배양방법.
- [청구항 20] 비-인간 동물로부터 세포를 분리하는 단계; 및
상기 분리된 세포를 현탁배양하는 단계
를 포함하는, 세포주의 제조방법에 따라 제조된 세포주를 포함하는 배양
육.