



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0132095
(43) 공개일자 2022년09월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/077 (2010.01) A23L 13/00 (2016.01)
C12M 1/12 (2006.01) C12M 1/24 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12N 5/0658 (2013.01)
A23L 13/00 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2021-0036743
(22) 출원일자 2021년03월22일
심사청구일자 2021년03월22일

(71) 출원인
강원대학교산학협력단
강원도 춘천시 강원대학길 1 (효자동)

(72) 발명자
임기택
강원도 춘천시 후석로 325 춘천포스코더샵아파트
112동 2308호
조성준
강원도 춘천시 남춘천새길 11 휴먼시아 남춘천1단
지아파트 110-1504
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
구현서

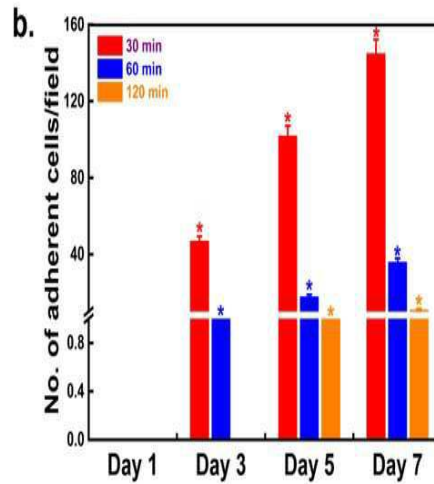
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 소 근육 위성 세포에 대한 단순화한 분리, 배양 및 배지 최적화 방법 및 그 용도

(57) 요약

본 발명은 소 근육 조직을 도축 후 30 분 이내에 근육 샘플을 수집하여 샘플을 요근에서 절제하고, 항생제를 함유하는 배지에서 배양하고, 상기 근육 샘플은 효소 소화 전에 세척한 후 상기 근육 샘플을 효소, 항생제 및 Amphotericin-B를 포함하는 배지와 함께 배양하고, 상기 효소처리된 근육 샘플을 원심 분리하여 수집하고 세척한 후, 상기 효소 소화된 조직 샘플을 항생제가 있는 고 포도당 배지를 포함하는 수집 배지에 재현탁한 후, 수득된 용액을 원심 분리하여 상층액을 수집하고 여과한 후, 상기 수집 배지에 재현탁한 다음 원심 분리하여 세포를 펠릿화한 후, 상기 세포 펠릿을 세척하고 성장 배지에 현탁하고 증식 환경에 시딩하여 배양하는 단계를 포함하는 소 근육 위성 세포에 대한 분리 및 1차 배양 방법을 제공한다.

대표도 - 도3b



(52) CPC특허분류

C12M 23/08 (2013.01)

C12M 25/06 (2013.01)

C12N 2500/30 (2013.01)

C12N 2509/00 (2013.01)

C12N 2533/54 (2013.01)

(72) 발명자

뎀 두타 사안

강원도 춘천시 강원대학길 1 강원대학교 농업생명
과학대학 1호관 307동 207호

강글리 케야

강원대학교 농업생명과학대학 1호관 307동 206호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1415169897
과제번호	20012439
부처명	산업통상자원부
과제관리(전문)기관명	한국산업기술평가원
연구사업명	산업기술알키미스트프로젝트(R&D)
연구과제명	배양육의 혁신적 원가절감을 위한 곤충 및 식물성기반 배양배지 및 자기장 복합 배
양시스템 개발	
기여율	1/1
과제수행기관명	강원대학교 산학협력단
연구기간	2020.09.01 ~ 2021.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

소근육 조직을 도축 후 30 분 이내에 근육 샘플을 수집하여 샘플을 요근에서 절제하고, 항생제를 함유하는 배지에서 배양하고, 상기 근육 샘플은 효소 소화 전에 세척하고, 상기 근육 샘플을 효소, 항생제 및 암포테리신(Amphotericin)-B를 포함하는 배지와 함께 배양한 후, 상기 효소처리된 근육 샘플을 원심 분리하여 수집하고 세척한 후, 상기 효소 소화된 조직 샘플을 항생제가 있는 고 포도당 배지를 포함하는 수집 배지에 재현탁한 후, 수득된 용액을 원심 분리하여 상층액을 수집하고 여과한 후, 상기 수집 배지에 재현탁한 다음 원심 분리하여 세포를 펠릿화한 후, 상기 세포 펠릿을 세척하고 성장 배지에 현탁하고 증식 환경에 시딩하여 배양하는 단계를 포함하는 소 근육 위성 세포에 대한 분리 및 1차 배양 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 항생제는 페니실린 및 스트렙토마이신인 소 근육 위성 세포에 대한 분리 및 1차 배양 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 효소는 프로나제 효소인 것을 특징으로 하는 소 근육 위성 세포에 대한 분리 및 1차 배양 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 고 포도당 배지의 포도당 농도는 4500.0 mg/L인 것을 특징으로 하는 소 근육 위성 세포에 대한 분리 및 1차 배양 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 성장 배지의 조성은 L-alanyl-L-glutamine 다이펩타이드를 포함하는 10% 우태아 혈청, 1 % 페니실린-스트렙토마이신 및 암포테리신 B를 포함하는 것을 특징으로 하는 소 근육 위성 세포에 대한 분리 및 1차 배양 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 증식 환경은 0.5 % 젤라틴 코팅된 플라스크인 것을 특징으로 하는 소 근육 위성 세포에 대한 분리 및 1차 배양 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

상기 세포를 시딩하여 배양하는 기간은 세포를 5-7 일 동안 성장시키는 것을 특징으로 하는 소 근육 위성 세포에 대한 분리 및 1차 배양 방법.

청구항 8

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항의 방법에 의하여 얻어진 배양액 또는 배양 결과물.

청구항 9

제 8 항의 배양액 또는 배양 결과물을 포함하는 배양 육 조성물.

청구항 10

제 8 항의 배양액 또는 배양 결과물을 포함하는 패티 제조용 조성물.

청구항 11

제 1항의 방법에 의하여 제조된 배양물로부터 얻어진 세포를 20 % 우 태아 혈청 및 10 % 말 혈청으로 보충된 고 포도당 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 소 근모세포 성장(myoblastic growth)을 촉진하는 방법.

청구항 12

제 11 항에 있어서,

상기 고 포도당 배지의 포도당 농도는 4500.0 mg/L인 것을 특징으로 하는 소 근모세포 성장(myoblastic growth)을 촉진하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 소 근육 위성 세포 (bMSC)에 대한 분리, 배양 및 배지 최적화 방법 및 그 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 2050년이 되면 전 세계 인구는 90억 명에 이르고, 인류의 육류 소비량 역시 465백만 톤에 달할 것으로 추정되고 있으며, 이에 국제연합식량농업기구(FAO)는 증가하는 육류 수요를 맞추기 위해 매년 2억 톤의 추가 생산이 필요함을 발표한 바 있다.

[0003] 또, 최근 들어 가축 광우병, 구제역 등의 가축 질병 문제, 가축 내장에 함유되어 있던 병원균이 가공 과정에서 사멸되지 않음으로 인해 각종 질환을 야기시키는 사례가 속속 발생하고 있어 사회적으로 큰 문제점을 야기시키고 있다.

- [0004] 이처럼 인구 증가 및 도축 가축에서 발생하는 질환 발생의 문제 등을 해결하기 위한 방안으로 최근 '배양 육 (cultured meat)'이 주목 받고 있다.
- [0005] '배양육'이란 가축을 사육하는 과정을 거치지 않고, 연구실에서 세포증식을 통해 얻게 되는 식용고기를 의미한다.
- [0006] 배양육과 관련된 기술을 살펴보면, "세포 배양법을 이용한 고기의 공업 생산 방법"(미국 특허등록 7270829호, 특허문헌)에는 근육 세포 등을 추출한 후, 배지에서 배양하여 3차원 동물 근육 조직을 제조하고, 이를 3차원화 가공하는 기술이 공개되어 있다.
- [0007] 그러나, 이러한 종래의 제조 방식의 경우 햄버거 패티 1개를 만드는 데 막대한 시간과 비용이 소요되는 문제점이 있었다.
- [0008] 이에 현재 배양육에 대해서는 제조 시간을 단축시키고, 제조 비용을 절감하며, 양질의 맛과 식감을 갖추도록 하는 데에 전세계의 많은 실험실에서 연구가 진행중에 있는 상태이다.
- [0009] 구체적으로, 현재의 연구 개발 방향은 소의 근육세포 등으로부터 추출된 줄기세포를 출발로 하여 실제 취식시 고기의 육질을 느낄 수 있을 정도로 근육을 형성하거나, 취식시 느껴지는 지방의 느낌도 느껴질 수 있도록 하기 위해 지방세포를 출발로 하여 지방을 형성하고, 이들의 배합을 통해 적절한 식감까지 느껴질 수 있도록 하려는 것으로 전세계적으로 상업성을 인정받은 정도의 기술 개발이 이루어지지 못하고 있는 실정이다.
- [0010] 한편, 골격근은 살아있는 유기체의 수축 운동을 담당하는 복잡한 다핵 구조이다.
- [0011] 배아 단계에서, 근 형성 전구 세포는 증식으로 알려진 과정에 의해 숫자가 증가한다. 나중에 전구 세포가 정렬되고 융합되어 근관으로 알려진 다핵 세포를 형성하며, 이는 수축성 근섬유로 더욱 발전한다.
- [0012] 성인의 경우 위성 세포 (SC)는 기저층과 근섬유의 혈장 기본형 사이에 위치한다. 새로운 myotube의 형성은 근육 조직에서 SC의 활성화, 증식 및 융합에 의해 크게 영향을 받는다. 근육 조직이 부상이나 스트레칭과 같은 다양한 외부 자극을 받으면 SC가 활성화되고 융합되어 근 모세포를 형성한다. 따라서 통제된 환경에서 근육 세포의 분리 및 체외 배양은 근육 생리학 및 분화 과정을 연구할 수 있는 기회를 제공한다.
- [0013] SC는 융합하는 동안 전체 근육 섬유 핵의 30-35 %를 포함하고 성인의 경우 5-10 %로 급격히 증가한 다음 노화에 따라 급격히 감소한다.
- [0014] SC의 분리 및 시험관 내 배양에 대한 여러 분리 프로토콜이 이전에 보고되었다. 대부분의 경우, SC의 분리는 근육 세포와 혈액 세포, 대 식세포, 지방 세포 등과 같은 비근원성 전구 세포의 혼합 집단을 야기하였다.
- [0015] 따라서 SC의 정제는 근육 세포 분리의 주요 기준 중 하나이다. 근성 집단을 분석하기 위해 형광 활성화 세포 분류(FACS), 자기 활성화 세포 분류(MACS), 면역 세포 화학(ICC) 또는 면역 조직 화학(IHC)과 같은 여러 기술이 설명되었다.
- [0016] [선행 특허 문헌]
- [0017] US 7,270,829 (20070918)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0018] 본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 신규한 소 근육 위성 세포 (bMSC)에 대한 단순화한 분리, 배양 및 배지 최적화 방법을 제공하는 것이다.
- [0019] 본 발명의 다른 목적은 신규한 소 근육 위성 세포 (bMSC)에 대한 단순화한 분리, 배양 및 배지 최적화 방법을 통하여 얻어진 결과물의 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0020] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은
- [0021] 소 근육 조직을 도축 후 30 분 이내에 근육 샘플을 수집하여 샘플을 요근에서 절제하고,

- [0022] 항생제를 함유하는 배지에서 배양하고,
- [0023] 상기 근육 샘플은 효소 소화 전에 세척하고,
- [0024] 상기 근육 샘플을 효소, 항생제 및 Amphotericin-B를 포함하는 배지와 함께 배양하고,
- [0025] 상기 효소처리된 근육 샘플을 원심 분리하여 수집하고 세척한 후,
- [0026] 상기 효소 소화된 조직 샘플을 항생제가 있는 고 포도당 배지를 포함하는 수집 배지에 재현탁한 후,
- [0027] 수득된 용액을 원심 분리하여 상층액을 수집하고 여과한 후,
- [0028] 상기 수집 배지에 재현탁한 다음 원심 분리하여 세포를 펠릿화한 후,
- [0029] 상기 세포 펠릿을 세척하고 성장 배지에 현탁하고 증식 환경에 시딩하여 배양하는 단계를 포함하는
- [0030] 소 근육 위성 세포에 대한 분리 및 1차 배양 방법을 제공한다.
- [0031] 본 발명의 일 구현예에 있어서,
- [0032] 상기 항생제는 페니실린-스트렙토마이신인 것이 바람직하고, 1% 페니실린-스트렙토마이신인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0033] 본 발명의 다른 구현예에 있어서,
- [0034] 상기 효소는 프로나제 효소인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0035] 본 발명에서 프로나제(pronase)는 *Streptomyces. griseus*로부터 유래한 단백질 분해 효소를 의미한다.
- [0036] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서,
- [0037] 상기 고 포도당 배지의 포도당 농도는 4500.0 mg/L인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0038] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서,
- [0039] 상기 성장 배지의 조성은 L-alanyl-L-glutamine 다이펩타이드를 포함하는 10% 우태아 혈청, 1 % 페니실린-스트렙토마이신 및 Amphotericin-B를 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0040] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서,
- [0041] 상기 증식 환경은 0.5 % 젤라틴 코팅된 플라스크인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0042] 본 발명의 일 실시예 있어서,
- [0043] 상기 세포를 시딩하여 배양하는 기간은 세포를 5-7 일 동안 성장시키는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0044] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 방법에 의하여 얻어진 배양액 또는 배양 결과물을 제공한다.
- [0045] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 배양액 또는 배양 결과물을 포함하는 배양 육 조성물을 제공한다.
- [0046] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 배양액 또는 배양 결과물을 포함하는 패티 제조용 조성물을 제공한다.
- [0047] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 방법에 의하여 제조된 배양물로부터 얻어진 세포를 20 % 우태아 혈청 및 10 % 말 혈청으로 보충된 고 포도당 배지에서 배양하는 단계를 포함하는 소 근육세포 성장을 촉진하는 방법을 제공한다.
- [0048] 본 발명의 일 구현예에 있어서,
- [0049] 상기 고 포도당 배지의 포도당 농도는 4500.0 mg/L인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0051] 본 발명의 용도 중에서 배양액 등을 이용한 햄버거 패티 제조 과정을 간단하게 설명한다.
- [0052] 본 발명에서 제조된 배양액은 그대로 패티 제조용 씨드 제조용 분무액으로 활용될 수 있고, 또는 배양액 중에서 근육 위성 세포나, 영양 단백질 외의 잉여 성분을 필터링한 후 사용될 수 있다.

- [0053] 배양 방식의 예로는 추출된 소의 근육 위성 세포는 10% FBS, 1% P/S가 첨가된 DMEM 배지에서 증식될 수 있다.
- [0054] 씨드 제조용 분무액이 준비된 후, 유동층코팅조건하에서 바텀스프레이(bottom spray) 형태로 분무하면서 반복적인 유동화를 통해 1500-2,500 μm 입자크기의 씨드를 제조한다.
- [0055] 씨드의 크기가 상기한 범위보다 작은 경우 패티 섭취시 육류 특유의 조직감을 거의 느끼지 못하게 되며, 씨드의 크기가 상기한 범위보다 작은 경우에는 목표로 하는 과립의 크기를 형성하기 위해 필요한 유동층 코팅 회수가 증가되어 생산성이 떨어지게 될 뿐만 아니라, 유동화 코팅 회수가 적어지게 되면 최종 생산되는 과립이 적어지게 되며, 이 경우 역시 패티 섭취시의 조직감이 나빠져 취식 선호도를 떨어뜨리게 된다.
- [0056] 바람직한 유동층 코팅 조건은 제품온도 90~110℃, 분무공기압력 10-30 bar, 투입관온도 20-60℃, 피딩속도 5-5,000g/min가 적합하다.
- [0057] 유동층 코팅 조건이 상기 온도 미만일 경우에는 배양액 제조 과정, 운반 과정 등에서 발생 가능한 병원균, 오염 등의 문제가 발생할 수 있으며, 상기 코팅 온도를 초과할 경우 씨드가 쉽게 부서지기 쉬워져 과립 제조시의 유동화 코팅 과정에서 과립 형성이 불균일해지는 문제점이 발생할 수 있다.
- [0058] 식물 유래 농축액을 코팅분무액으로 준비하고, 상기 씨드를 유동층코팅기 내부에 투입한 후, 상기 코팅분무액을 유동층코팅조건하에서 바텀스프레이(bottom spray) 형태로 분무하면서 반복적인 유동화를 통해 씨드에 코팅하여 씨드 함량 비율이 30 내지 70중량 %가 되는 구형 과립을 제조한다.
- [0059] 씨드 함량 비율이 30 중량% 미만인 경우 유동화 공정의 횟수가 과도하게 증가하게 되어 생산성이 떨어지게 되며, 반대로 씨드 함량이 70중량%를 초과하는 경우에는 제조된 과립의 형상이 구형을 벗어나 불규칙해지게 되며, 이는 패티를 제조하기 위한 성형 과정에서 기공 형성이 적어지게 되고, 이로 인해 지방 성분의 침투가 원활이 이루어지지 못하여 취식시의 조직감이 저하되게 된다.
- [0060] 유동화 코팅의 횟수는 유동화가 진행될 때마다 성형되는 중간 과립의 크기에 따라 다양하게 이루어질 수 있다.
- [0061] 제조가 완료된 구형과립의 크기는 15 ~ 35mm 정도의 크기가 바람직하다.
- [0062] 더불어, 유동층 코팅 조건은 제품온도 50-60℃, 분무공기압력 10-30 bar, 투입관온도 20-60℃, 피딩속도 5-5,000g/min 등의 조건이 적합하다.
- [0063] 과립제조시의 유동층 코팅 온도가 씨드 제조시보다 낮은 것은 씨드의 손상을 방지하고, 코팅 과정에서 식물 유래 농축액이 급속하게 분말화되는 것을 방지하면서 원활하게 씨드 표면에 코팅될 수 있도록 하기 위함이다.
- [0064] 상기 식물 농축액은 공지되어 있는 다양한 버섯 또는 콩 등의 농축액이 활용될 수 있으나, 물 단독으로 추출된 농축액은 지양하며, 알콜 함량이 50% 이상 첨가된 희석 알코올을 이용하여 식물 중의 지용성 성분이 다량 추출될 수 있도록 한다.
- [0065] 이어 이 혼합액을 60 ~ 80℃에서 5시간 가열하여 추출액을 수득한 후, 수득된 추출액을 여과시킨 후 50℃, 70mmHg 조건에서 진공 농축하여 수득된 것으로 이루어질 수 있다.
- [0066] 상기 구형과립에 액상의 식용 지방을 혼합 및 교반하여 패티조성물을 제조한다.
- [0067] 식용 지방의 첨가 비율은 구형 과립 100 중량부 대비 5 ~ 30 중량% 이루어질 수 있으며, 상기 범위 내에서 제조할 패티의 종류에 따른 소비자 기호도에 따라 가감될 수 있다.
- [0068] 액상의 식용 지방은 가축 지방, 어류 지방, 견과류 지방 등 다양한 식용 지방이 가능하다.
- [0069] 이중에서도 견과류와 같은 식물성 지방을 사용하는 것이 바람직하다 할 것인데, 이는 가축의 근육 위성 세포를 활용하여 패티를 제조하는 근본적인 목적이 가축 수요 부족 및 가축 질환으로 인한 인체 감염을 방지하기 위한 목적인 바에 근거한다.
- [0070] 상기 패티조성물을 패티용 틀에 투입하여 성형한 후 경화시켜 패티를 제조한다.
- [0071] 패티용 틀은 제조하고자 하는 패티의 형상에 따라 원, 타원 등 다양한 형태로 이루어질 수 있다.
- [0073] 이하 본 발명을 설명한다.
- [0074] 본 발명에서 본 발명자들은 소 근육 위성 세포 (bMSC)에 대한 분리, 배양 및 배지 최적화를 위한 간단하고 신

퇴할 수 있는 기술을 제공한다.

[0075] 이를 위해 본 발명자들은 bMSC의 배양을 위해 저농도 젤라틴 코팅 배양 플라스크를 사용했다. 높은 포도당, 소테아 혈청 (FBS) 및 말 혈청 (HS)이 있는 성장 배지는 소 근육 조직에서 많은 bMSC를 생성한다. bMSC의 특성화는 Desmin 및 Myogenin과 같은 근원성 마커를 확인하기 위해 FACS 및 면역 세포 화학적 기술을 사용하여 수행되었다. 본 발명의 프로토콜은 간단하고 시간 친화적이며 재현 가능하다.

발명의 효과

[0077] 본 발명을 통하여 알 수 있는 바와 같이, 본 발명은 소 myosatellite 세포 (bMSCs) 분리 및 배양의 수정된 방법을 입증했다. 이 방법은 간단하고 신뢰할 수 있으며 다른 확립된 프로토콜에 비해 고품질의 myosatellite 세포를 생성하여,

[0078] 본 발명의 결과는 특히 식품 과학 및 기술 분야에서 실제 응용을 위한 소 근성 세포의 단순하고 높은 수율 분리를 보여준다.

도면의 간단한 설명

[0079] 도 1(a)는 소 근육 위성 세포 (bMSC) 분리를 위한 프로토콜의 개략도이고, (b)는 분리 과정의 디지털 사진으로; 조직 수집 및 소화 (i-iv), 세포 펠렛 수집 (v), 0.5 % 젤라틴 코팅 플라스크에서 세포 배양 (vi-vii). 스케일 바 : 100 μ m.

도 2는 bMSC의 형태학적 특징. 표시된 시간 간격에서 아웃그로쓰를 보여주는 배양된 세포의 광학 현미경 이미지. 스케일 바: 100 μ m.

도 3은 1차 배양 광학 현미경에 의한 세포 접착 평가를 나타낸 것으로,

(a) 대표적인 명 시야 이미지 및

(b) 부착 세포 수에 대한 정량화 값. 스케일 바 : 100 μ m.

도 4는 1차 배양 bMSCs의 형태학적 특징을 나타낸 그림으로, (계대 -1)은 지정된 시간 간격에서 성장 배지의 섬유 아세포와 같은 형태와 분화 배지의 근성 성장을 보여준다. 스케일 바 : 100 μ m.

도 5는 1차 배양 소 근육 조직에서 분리된 bMSC의 특성화를 나타낸 그림으로,

(a-b) 10 일된 배양 플레이트에서 bMSC의 FACS 분석. 세포는 Desmin 및 Myogenin에 대한 AF-488 접합 이차 항체로 염색되었다.

(c) M1 게이트에서 FACS 분석의 정량적 값.

(d) myogenic 단백질 마커를 사용하여 파생 세포의 면역 염색.

스케일 바 : 100 μ m.

도 6은 계대 -1에서 bMSC의 대표적인 면역 조직 화학 (IHC) 염색을 나타낸 그림으로,

세포를 성장 배지에서 24 시간 동안 배양하고 myoblast-specific 항체로 염색했다. 검은 색 화살표는 IHC 염색 후 양성 반응의 존재를 나타낸다. 스케일 바 : 50 μ m.

도 7은 표시된 시간 간격으로 WST-8 분석에 의해 계대 -1에서 bMSC의 세포 생존력 평가를 나타낸 그림으로, 데이터는 삼중 실험의 평균 \pm SD, * p <0.05에서 통계적 유의성.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0080] 이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.

[0081] 실시예 1: 샘플 수집

[0082] 소근육 조직 (성체 암컷 소, 40 주령)은 대한민국 춘천 흥천 육 공장에서 채취했다. 도축 후 30 분 이내에 근육

샘플 (2-4g)을 수집하여 실험실로 옮겼다.

[0083] 샘플을 요근에서 절제하고 1 % 페니실린-스트렙토마이신 (P/S; Gibco-BRL, Grand Island, USA) 용액을 함유하는 Dulbecco 's Modified Eagle Media (DMEM; Welgene, 대한민국) 20 mL에서 배양했다.

[0084] 채취한 조직을 인산 완충 식염수 (PBS; Welgene, 대한민국)로 여러 번 세척하여 조직에서 적혈구 (RBC)를 제거했다.

[0086] 실시예 2: 조직 소화 용액의 준비

[0087] 근육 샘플은 효소 소화 전에 철저히 세척되었다. 세포 분리 절차는 이전에 보고 된 프로토콜에서 수정되었다 [Baquero-Perez, B.; Kuchipudi, S.V.; Nelli, R.K.; Chang, K.-C. A simplified but robust method for the isolation of avian and mammalian muscle satellite cells. *BMC cell biology* **2012**, *13*, 1-12.; Ben-Arye, T.; Shandalov, Y.; Ben-Shaul, S.; Landau, S.; Zagury, Y.; Ianovici, I.; Lavon, N.; Levenberg, S. Textured soy protein scaffolds enable the generation of three-dimensional bovine skeletal muscle tissue for cell-based meat. *Nature Food* **2020**, *1*, 210-220].

[0088] 약 3-4g의 다진 근육을 1.4mg mL⁻¹ 프로나제 효소(Sigma-Aldrich, USA), 1 % P/S 및 Amphotericin-B를 포함하는 30 mL의 DMEM/Ham's F12(1:1) 배지와 함께 배양했다.

[0089] 37 ° C의 교반 수조에서 1.5 시간 동안. 소화된 근육 조직을 300g에서 원심 분리하여 수집하고 PBS (10 mL/튜브)로 2 회 세척하였다.

[0091] 실시예 3: 세포 분리 프로토콜

[0092] 소 근육 위성 세포 (bMSCs) 분리 과정에 대한 개략적인 그림은 도 1에 나타내었다.

[0093] 동물 실험 윤리위원회는 강원 대학교의 동물 조직 취급 및 배양에 관한 모든 절차를 승인했다(허가 번호 KW-210317-1).

[0094] 요약하면, 이전 단계에서 소화된 조직 샘플을 50 mL 튜브에 채취하고 1 % P/S가 있는 고 포도당 DMEM (DMEM-Glutamax-1; Invitrogen, Thermo-Fischer Scientific, USA)을 포함하는 15 mL 수집 배지에 재현탁했다.

[0095] 소화된 조직 샘플은 조직의 세포를 방출하기 위해 적어도 10-15 회 격렬한 피펫팅을 받았다.

[0096] 수득된 용액을 300g에서 3 분 동안 원심 분리하여 조직 단편을 펠릿 다운시켰다. 원심 분리 후 방출된 세포를 포함하는 상층액을 수집하고 40 μm 세포 스트레이너 (BD Falcon, Corning, U.S.A.)를 통해 조심스럽게 여과했다.

[0097] 세포를 수집하고 수집 배지에 재현탁한 다음 격렬한 피펫팅을 수행했다. 다음으로, 세포를 800g에서 10 분 동안 원심 분리하여 세포를 펠릿화하였다. 세포 분리 및 배양에 사용되는 배지의 구성은 표 1에 나열되어 있다.

표 1

과정	배지 조성
근육 조직 수집	DMEM, 1% P/S solution, Amphotericin-B
효소 소화용 스탁 용액	DMEM/Ham's F12 (1:1), pronase (1.4 mg/mL), 1% P/S solution, Amphotericin-B
수집 배지	DMEM-Glutamax-1, 1% P/S, Amphotericin-B
성장 배지	DMEM-Glutamax-1, 10% FBS, 1% P/S, Amphotericin-B
분화 배지	DMEM-Glutamax-1, 20% FBS, 10% HS, 1% P/S, Amphotericin-B

[0100] 표 1은 소 세포 분리 및 배양에 사용되니 배지 조성물 리스트,

[0101] 표에서 DMEM; Dulbecco's Modified Eagle Media, P/S; Penicillin/streptomycin, FBS; fetal bovine serum,

HS; Horse serum.

- [0102] 상기 상업적인 배지 조성 중에서,
- [0103] DMEM-Glutamax-1™ 정보는 <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/10569010#/10569010>의 Technical Resources - Media Formulations 10566 - DMEM, high glucose, GlutaMAX(TM)의 Catalog Number(s) 10566016을 참고하고,
- [0104] GlutaMAX™ supplement는 0.85% NaCl에 200 mM L-alanyl-L-glutamine dipeptide로 제공되며,
- [0105] 해당 배지에서 고 포도당의 포도당 농도는 4500.0 mg/L이다.
- [0107] 실시예 4: bMSC의 세포 플레이트링 및 1 차 배양
- [0108] 이전 단계에서 얻은 세포 펠렛은 일차 세포 배양에 직접 사용되었다.
- [0109] 요약하면, 세포 펠렛을 PBS로 2 회 세척하고 성장 배지에 현탁하고 0.5 % 젤라틴(1X PBS 중 0.5 % 젤라틴, 필터 멸균, Sigma-Aldrich, USA) 코팅 T75 플라스크에 37 ° C에서 5 % CO₂에서 시딩하였다. 48 시간 후, 세포를 따뜻한 PBS로 여러 번 세척하여 파편과 적혈구를 제거했다.
- [0110] 다음 24 시간 동안 세포 배양 배지를 자주 교체하여 잔해물과 오염물을 제거했다. 세포를 5-7 일 동안 성장시켰다.
- [0111] 오래된 미디어는 이를 마다 교체되었다.
- [0112] 모든 세포 배양 실험에서 세포는 계대 2까지 유지되었다. 계대를 위해 세포의 함유 단층을 트립신 처리 (0.25 % 트립신-EDTA, Sigma-Aldrich, USA)하고 20 % HS (Merck-Millipore, U.S.A.) 및 10 % DMSO (Sigma-Aldrich, USA)를 사용하여 동결시켰다.
- [0114] 실시예 5: 근성 세포 집단의 결정
- [0115] 형광은 FACS (passage-0 Activated cell sorting) 방법에서 근 모세포 특이 적 마커의 발현을 평가했다.
- [0116] 이를 위해 1.5×10^4 개의 세포를 6 웰 플레이트에 시드하고 2-3 일 동안 성장시켰다. 그 후 세포를 수거하여 3.7 % 파라 포르름 알데히드 (PFA; Sigma-Aldrich, USA)로 10 분 동안 고정하고, 1 % 소 혈청 알부민 (BSA; Sigma-Aldrich, USA)으로 30 분 동안 차단하고 특정 Desmin 및 Myogenin (Santa Cruz Biotechnology, USA)에 대한 1 차 항체로 4 ° C에서 1 시간 동안 염색하였다.
- [0117] 다음으로, 세포를 PBS로 세척하고 AF-488 접합된 2 차 항체와 함께 실온에서 1 시간 동안 배양하였다. Desmin 및 Myogenin 양성 세포의 비율은 FACS-caliber (BD Biosciences, USA)로 분석하고 데이터는 Cell Quest Pro 소프트웨어를 사용하여 정량화했다.
- [0119] 실시예 6: 면역 세포 화학
- [0120] 면역 세포 화학적 (ICC) 염색을 위해, 4×10^4 개의 계대 세포 세포를 15 분 동안 4 % PFA로 고정하고, 10 분 동안 0.1 % Triton X100으로 투과화하고, 실온에서 1 시간 동안 1 % BSA로 차단했다. 다음으로 세포를 Desmin(1 : 150) 및 Myogenin (1 : 250)에 대한 특정 1 차 항체와 함께 1 시간 동안 배양한 후 AF-488 접합 2 차 항체와 1 시간 동안 배양했다.
- [0121] 핵은 DAPI (Sigma-Aldrich, USA)에 의해 대조 염색되고 도립 형광 현미경 (DMI8, Leica Microsystems, Germany)으로 시각화되었다. 이미지는 40 배 배율로 캡처하고 ImageJ 소프트웨어 (ImageJ, v1.8, NIH, Bethesda, MD, USA)로 처리했다.
- [0122] 면역 조직 화학 (IHC) 분석을 위해 세포를 4 % PFA로 15 분 동안 고정하고 내인성 퍼옥시다제 차단제로 10 분 동안 차단했다. 다음으로, 세포를 Tris 완충 식염수 (T.B.S., Bio-Rad, Germany)로 세척하고 Desmin 및

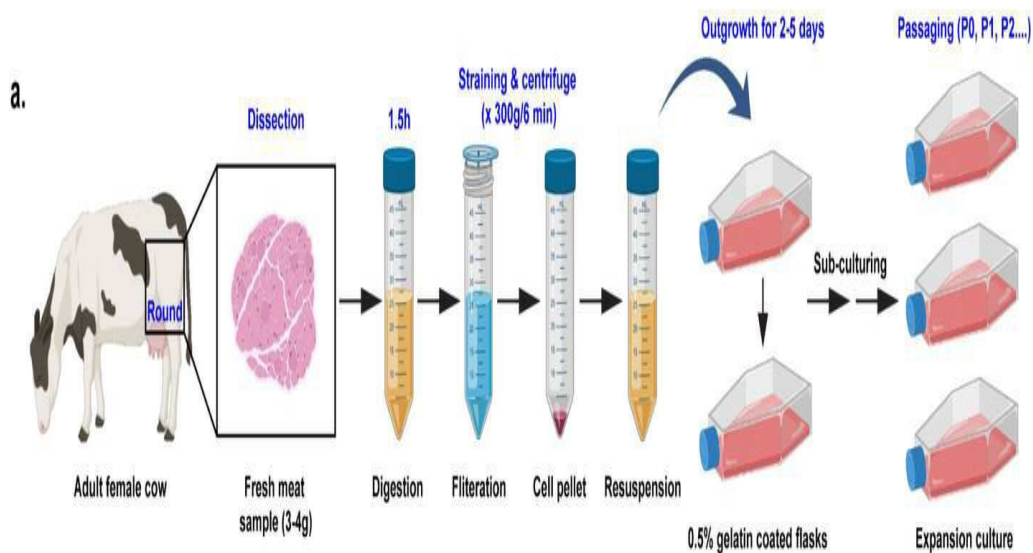
Myogenin에 대한 특정 항체와 함께 배양했다.

- [0123] 모든 항체는 미국 Santa Cruz Biotechnology에서 구입했다. 염색된 세포를 TBS로 세척하고 DAB 기질 키트 (Abcam, USA)로 5 분 동안 염색한 후 Harris 'Hematoxylin 용액 (Sigma-Aldrich, USA)으로 염색하여 핵을 염색 하였다. 1 차 항체를 생략하고 음성 염색을 수행했다.
- [0125] 실시예 7: 세포 생존력 분석
- [0126] bMSC (계대 -0 및 계대 -1)의 생존력은 배양 5 일 후 성장 및 분화 배지의 존재하에 평가되었다.
- [0127] 요약하면, 세포 (1.5 x 10⁴/웰)를 96-웰 플레이트에 시드하고 5 % CO₂ 환경에서 37 ° C에서 5 일 동안 배양하고 10 % FBS 함유 배지를 대조군 세트로 취했다. 특정 시간 간격으로 세포를 PBS로 세척하고 새로운 배지로 교체했다.
- [0128] 다음으로, 세포를 10 μL의 WST-8 염료(대한민국 셀릭스 생존력 분석 키트)와 함께 배양하고 2 시간 동안 배양 하였다. 반응된 포르마잔은 450nm (625nm 기준값)에서 흡광도를 기록하여 측정했다. 모든 실험은 삼중이고 데이터는 평균±SD로 표시된다.
- [0130] 본 발명에서 수행된 통계 분석은 Origin Pro 9.0 소프트웨어를 사용하여 일원 분산 분석으로 통계 분석을 수행 했다. 모든 실험은 3 회 (n = 3)로 수행되었으며 결과는 평균±SD, * p <0.05에서 통계적 유의성으로 표시된다.
- [0132] 상기 실시예의 결과를 하기에 기재한다.
- [0133] 소화된 조직에서 bMSC의 증식물(OUTGROWTH)
- [0134] 위성 세포(SCs)는 골격근 조직의 주요 전구 세포이다. 이들은 단핵 세포이며 근육 조직에 분포한다. 근육 조직 의 생리학과 발달을 연구하기 위해 위성 세포를 분리, 배양하고 성인 근 모세포로 분화할 수 있다.
- [0135] 본 발명에서 본 발명자들은 소 근육 조직에서 bMSC를 분리하는 간단한 방법을 설명한다. 그림 2a에서 볼 수 있 듯이 단핵 세포는 젤라틴 코팅 된 표면에서 성장하고 7 일의 1 차 배양 후 T75 플라스크의 전체 영역을 덮었다.
- [0136] 더욱이, 우리는 효소 소화 전에 고기 샘플을 오래 보관했을 때 세포 접착 효율이 감소하는 것을 보았다.
- [0137] 도 3a에서 알 수 있듯이, 조직 샘플이 도축 직후 (~ 30 분) 소화되었을 때 부착 세포의 수가 증가했다. 그러나 조직 샘플을 소화하기 전에 장기간 보관하면 세포 수가 감소했다. 부착 세포 수의 정량적 값은 도 3b에 나와 있 다.
- [0138] 파생 세포는 비교적 작고 섬유 아세포와 유사한 외관을 나타낸다. 20 % FBS 및 10 % HS로 보충된 고 포도당 DMEM 배지는 도 4에 표시된 것처럼 근 모세포 성장을 촉진한다.
- [0140] bMSC의 특성화
- [0141] myosatellite 세포는 Desmin(Des), Myogenin(Myo), Paxillin-7(Pax-7) 등과 같은 다양한 myoblast-specific 마 커의 존재를 특징으로 한다.
- [0142] bMSCs (passage-0)는 Desmin 양성 및 Myogenin 양성 세포를 결정하기 위해 골격근 특이 적 마커로 염색되었으며 그 결과는 도 5 (a-b)에 나와 있다.
- [0143] FACS 분석은 계대 1에서 Desmin (73.13 ± 2.3) 및 Myogenin (95.03 ± 4.58) 양성 세포의 존재를 모두 나타냈 다. 흥미롭게도 Myogenin 양성 세포의 수가 Desmin보다 높았는데 이는 추출된 세포가 근육 전구 세포임을 시사 한다.
- [0144] FACS 분석의 정량적 값은 도 5c에 나와 있다. 실제로, 한 라운드의 하위 배양(계대-1) 후, 세포는 도 5d에 표시 된 것처럼 근 모세포 마커에 대해 양성인 것으로 나타났다.

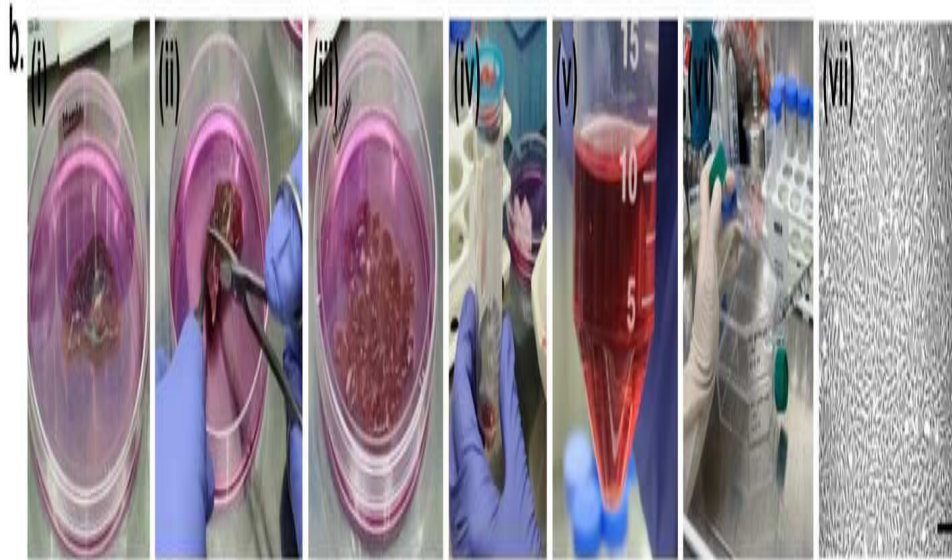
- [0145] 이러한 결과는 bMSC의 P0-P1 계대가 myogenic 특성을 유지하고 세포의 계대가 발현 속도를 변경하지 않음을 나타낸다.
- [0146] 면역 조직 화학 분석
- [0147] myogenic 마커의 존재를 조사하기 위해, 면역 조직 화학 염색은 세포 배양 24 시간 후에 수행되었다. 핵은 헤마톡실린 용액으로 염색되었다.
- [0148] 도 6에서 볼 수 있듯이, 계대-1 bMSC는 두 근성 마커를 모두 높은 수준으로 표현했다. 따라서 추출 된 세포는 1차 근성 세포로 확인되었다.
- [0150] bMSC의 생존력
- [0151] bMSC (계대 -1)의 세포 생존력은 성장 및 분화 배지에서 평가되었으며 그 결과는 도 7에 나타내었다.
- [0152] 두 배지 보충제 모두에서 세포의 생존력에 큰 변화가 없었으며, 이는 반복 된 계대가 영향을 미치지 않았음을 나타낸다.
- [0153] 세포 노화. 세포의 반복적인 계대는 텔로미어 영역에서 염색체의 단축으로 인해 세포의 생존력에 영향을 미칠 수 있다. 텔로미어 영역의 손실로 인해 중요한 유전자가 손실되어 유전자 발현, 세포 형태 및 세포 증식에 영향을 미친다.
- [0154] 본 발명의 결과는 bMSC가 초기 계대 동안 정상적인 형태와 생존력을 유지했음을 나타낸다.
- [0155] 본 발명의 결과는 특히 식품 과학 및 기술 분야에서 실제 응용을 위한 소 근성 세포의 단순하고 높은 수율 분리를 보여준다.

도면

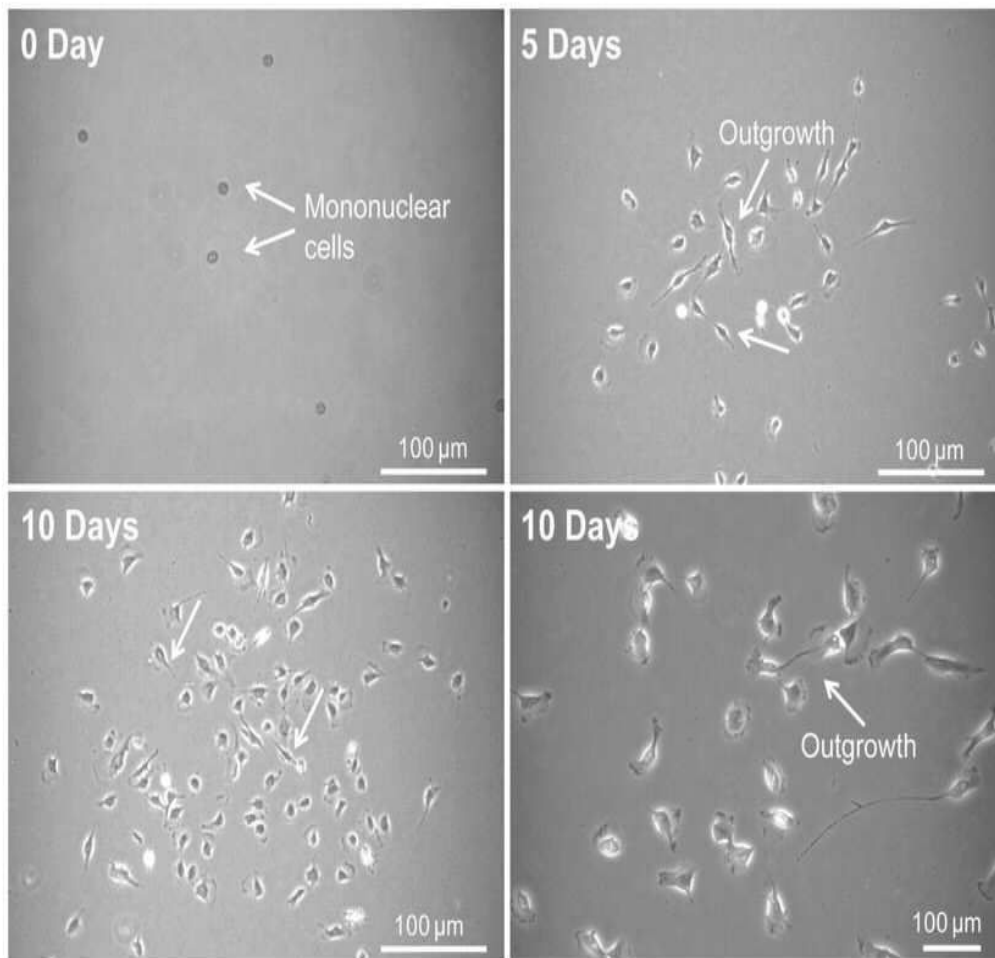
도면1a



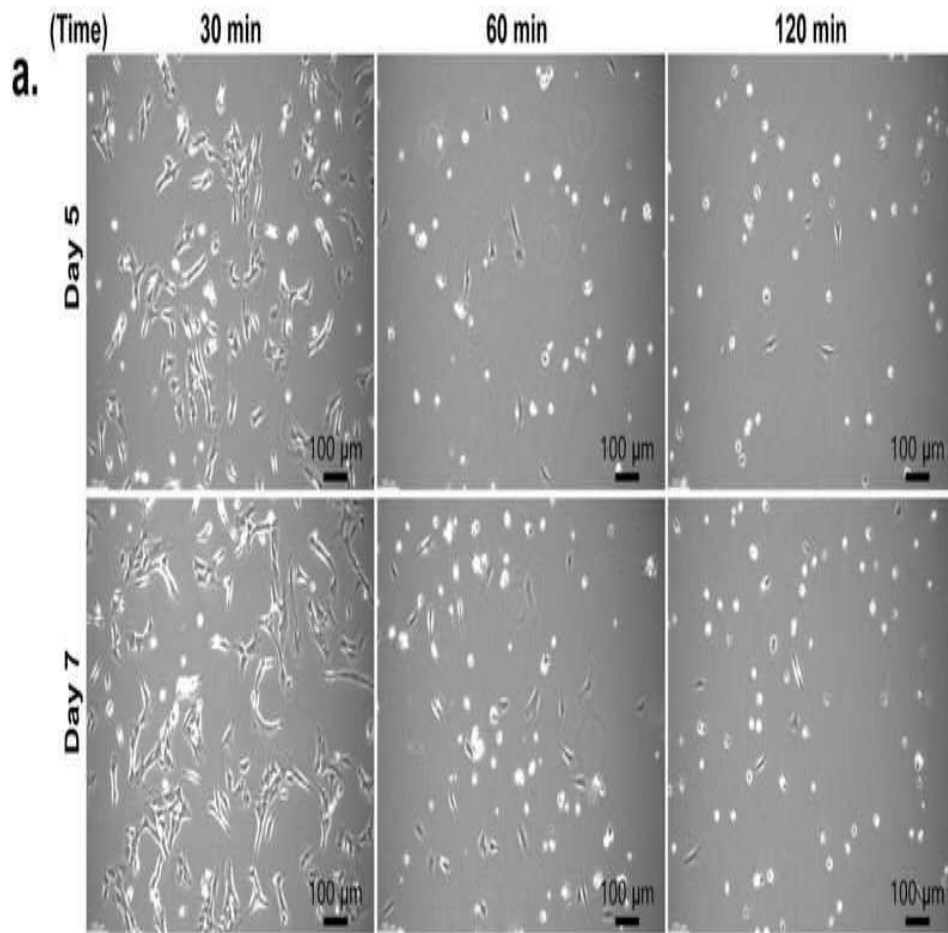
도면 1b



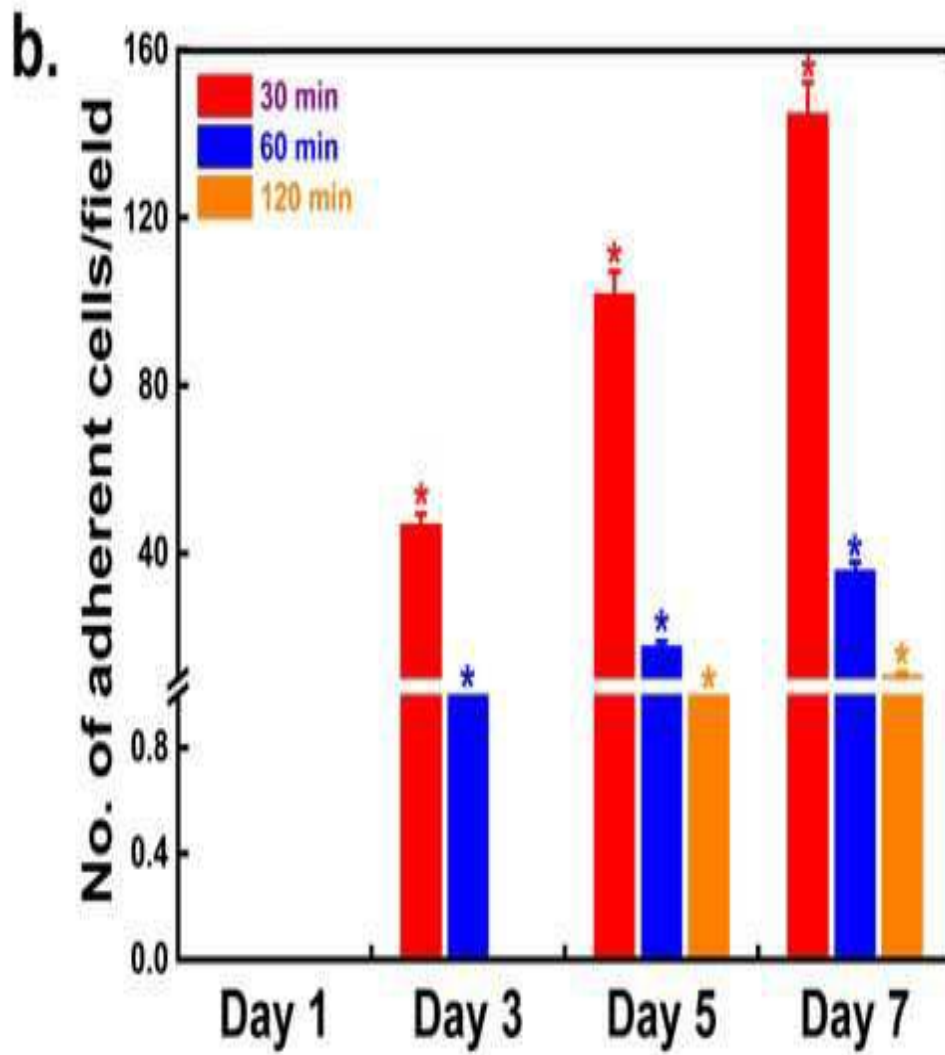
도면2



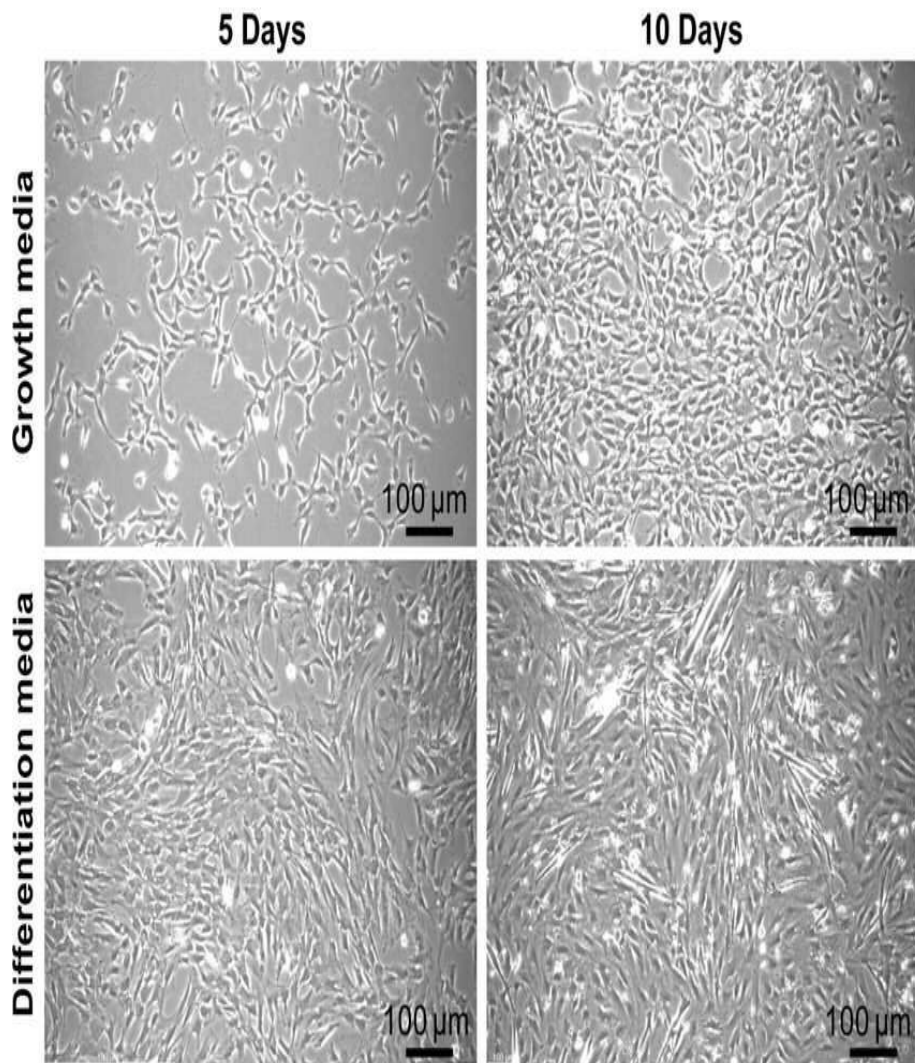
도면3a



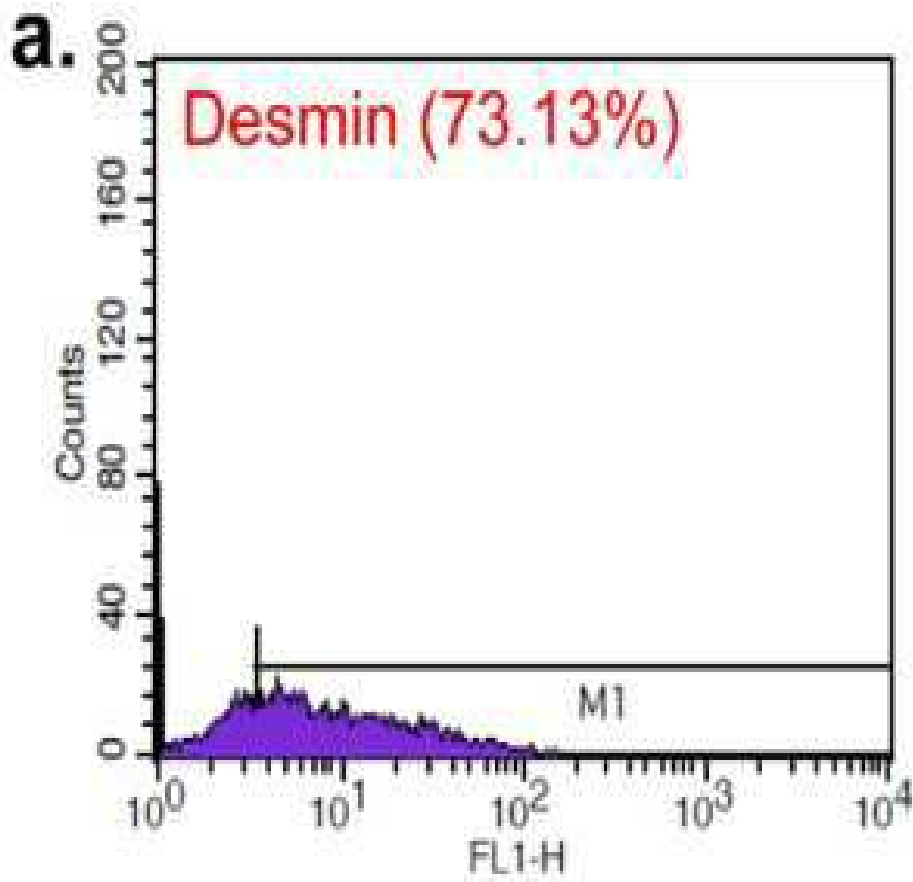
도면3b



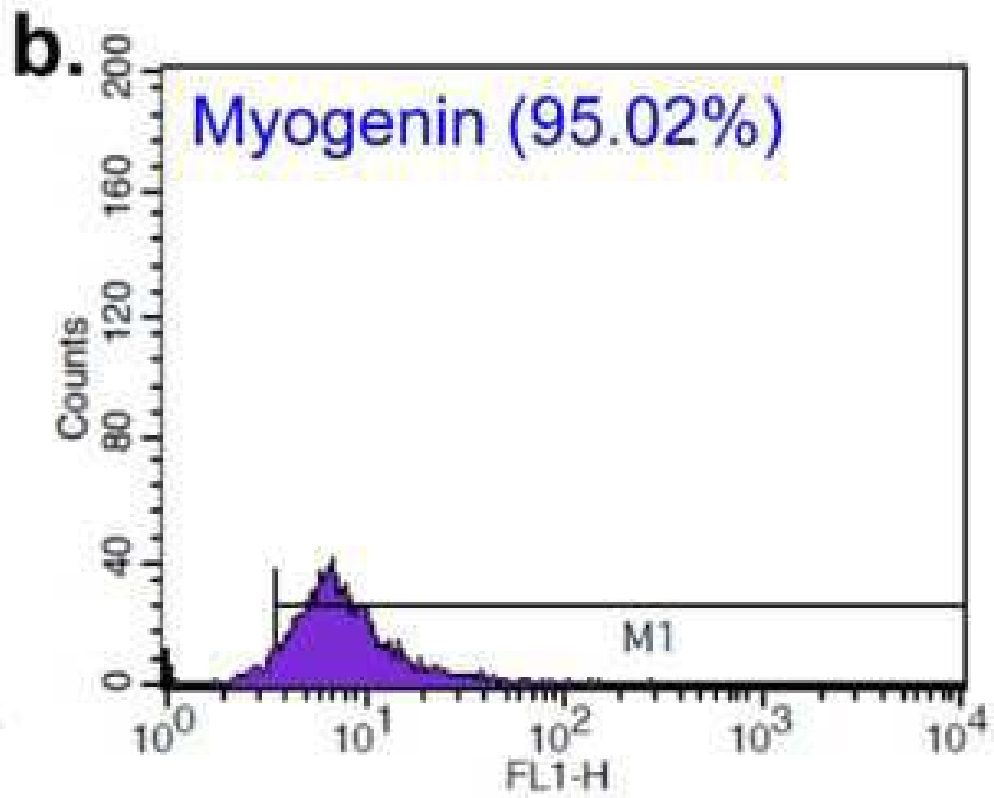
도면4



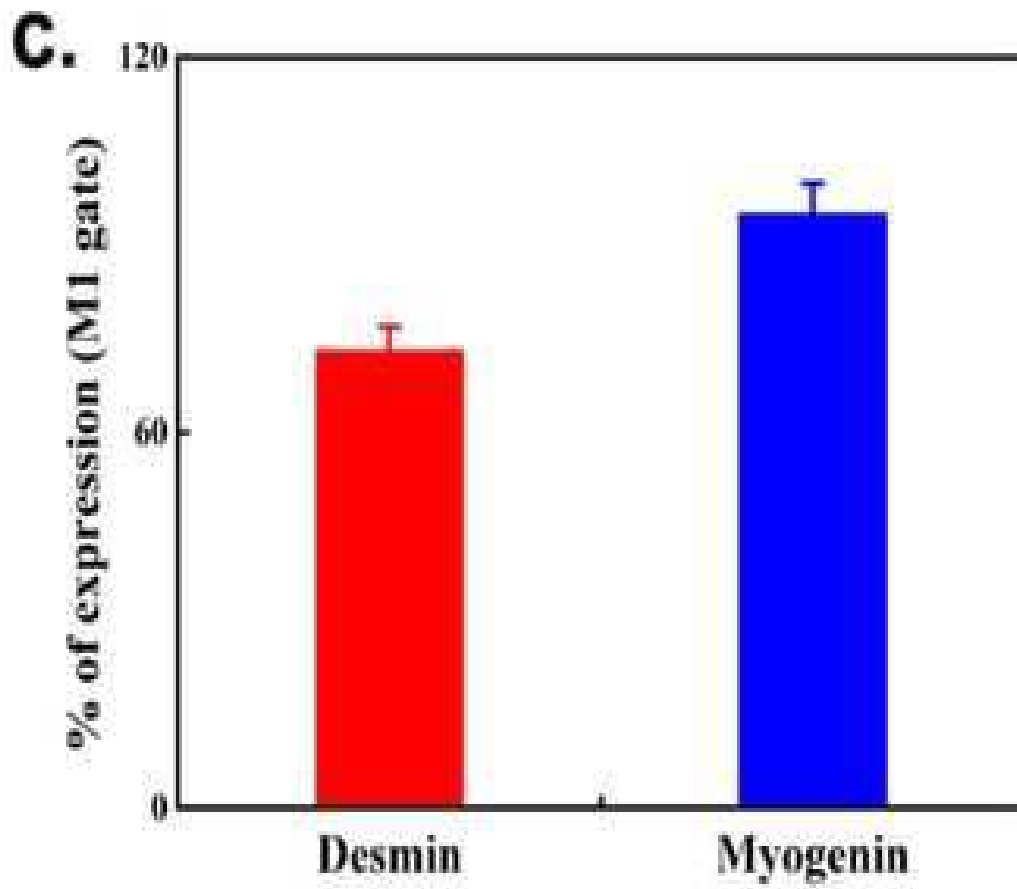
도면5a



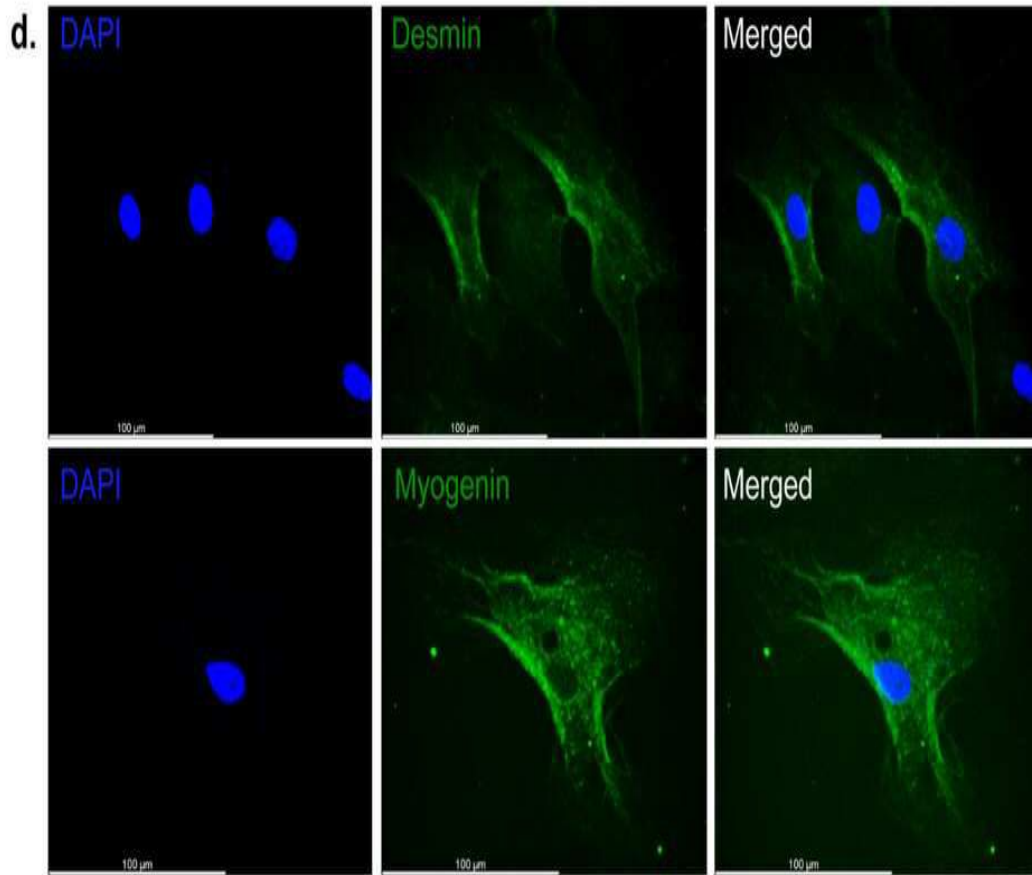
도면5b



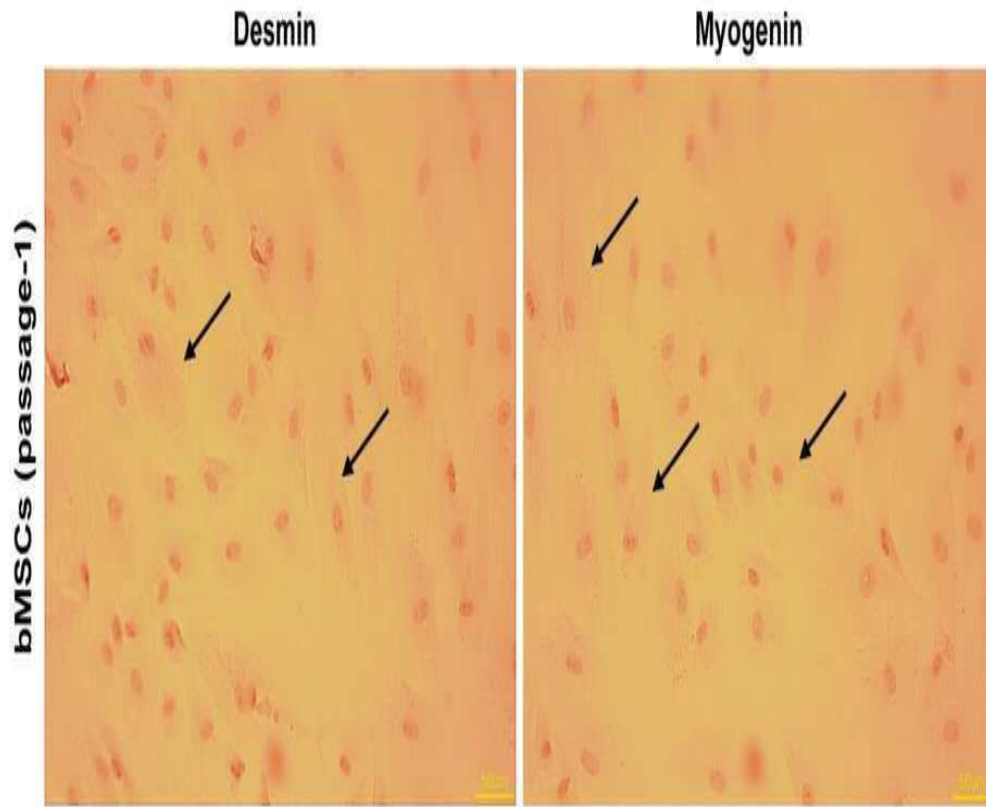
도면5c



도면5d



도면6



도면7

