

## 기술 설명서 요약본

기술명	갑각류 세포주의 확립 및 세포 맞춤 배양액의 개발	
기술분류 (대분류-중분류)	대분류-중분류 (해양수산생명-해양수산생물자원)	
공사 관련 기술 여부	공사 외 기술	공사 관련 기술
	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
기업명	셀미트 주식회사	

### 기술 개요

#### ■ 신청 기술 주요내용 및 특징

##### 1. 갑각류(새우, 게 또는 랍스터 등)의 세포주 확립방법

신청기술에서 생물학적 또는 화학적 외인성 불멸화 인자를 처리하여 세포의 불멸화를 유도하지 않고도 갑각류의 세포주를 최초로 확립함.

##### 가. 콜라겐 분해효소 처리단계

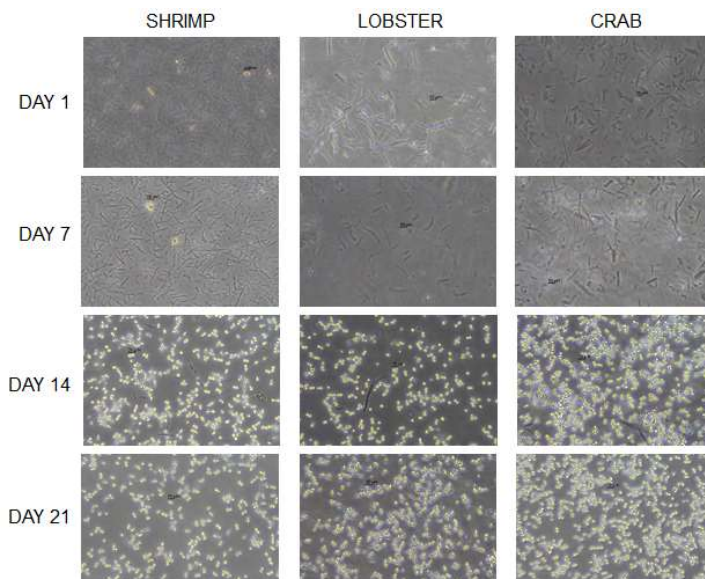
갑각류 세포에 악영향을 주지 않기 위하여 낮은 온도에서도 활성을 갖고 있는 콜라겐 분해효소를 이용하여 세포를 조직으로부터 분리하는 작업을 진행하며, 세포에 영향을 주지 않으면서 조직으로부터 분리할 수 있는 최적의 온도와 처리 시간 등을 자체 연구를 통하여 찾아냄.

##### 나. 순차적 세포 분리 단계

기존에는 세포에 영향을 미칠 수 있는 단백질 분해효소를 장시간 처리하고, 조직으로부터 세포를 단일 체 반 사이즈로 분리함. 그러나 갑각류 세포는 효소, 온도 및 처리 시간에 민감하게 반응하므로, 효소에 대한 영향을 줄이기 위하여 순차적 분리 시스템을 적용하여 조직으로부터 갑각류 세포를 분리함.

##### 다. 세포주 제조와 증식을 위한 1차·2차 부유배양 단계

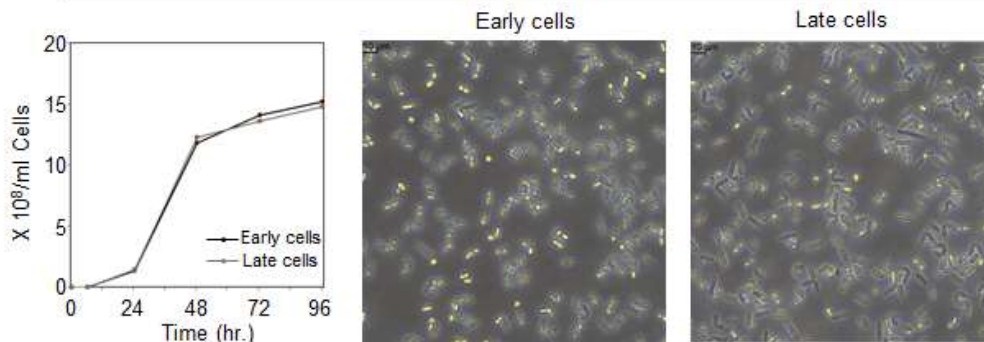
세포주 제조를 위한 1차 배양(7일 이상, 바람직하게는 14일 이상)과 세포주 증식을 위한 2차 배양(1주 이상)으로 분리하여 진행하고, 기본 배지에 항생제 첨가량을 달리하는 1차·2차 배양으로 분리하여 식품 적합성을 크게 향상시킴. 1차·2차 부유배양에 따른 세포 배양 결과는 아래 현미경 관찰 사진을 통하여 확인할 수 있으며, 세포 배양 후 7일 내지 14일에 3 내지 10 $\mu$ m 크기의 세포 증식을 분명히 관찰할 수 있음.



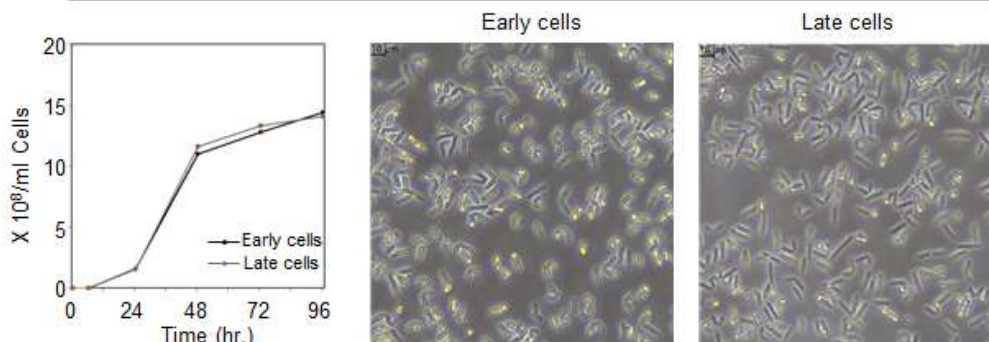
또한, 일반 세포주 구축실험에서는 세포 분리 후 부착배양으로 세포를 구축하지만, 신청기술에서는 세포를 기질 등에 고정시키지 않는 부유배양을 활용하여 세포증식 효율을 상당히(부착배양에 비해 10배 이상) 향상시킴.

갑각류로부터 분리한 세포가 지속적인 성장을 하는 세포주로 확립되었는지를 확인하기 위하여 갑각류 세 가지(새우, 게, 랍스터) 종의 세포를 3주 동안의 1차 · 2차 부유배양 거쳐 확립된 세포(Early cells)와 그 이후로 1달 동안을 더 배양한 세포(Late cells)의 성장 곡선을 비교함. 아래 그림에서 Early cells와 Late cells 간에 세포 성장의 차이가 없는 것을 확인할 수 있고, 각 시간별 세포들을 관찰한 결과 세포 모양도 흡사한 형태를 띠고 있음.

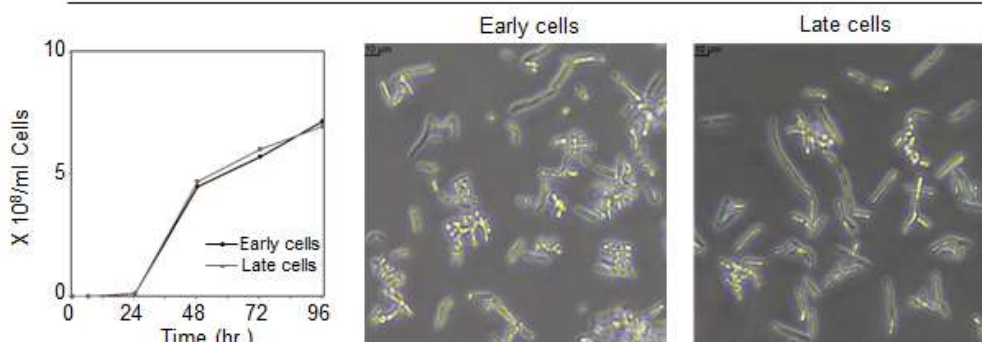
#### SHRIMP CELLS



#### LOBSTER CELL



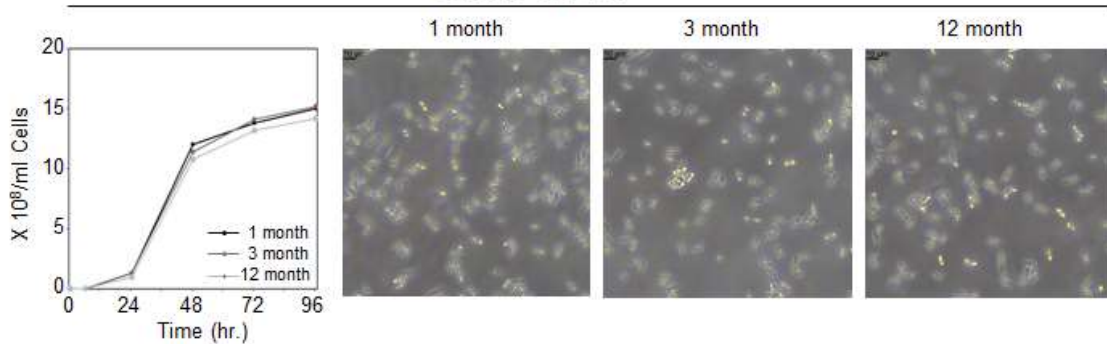
#### CRAP CELLS



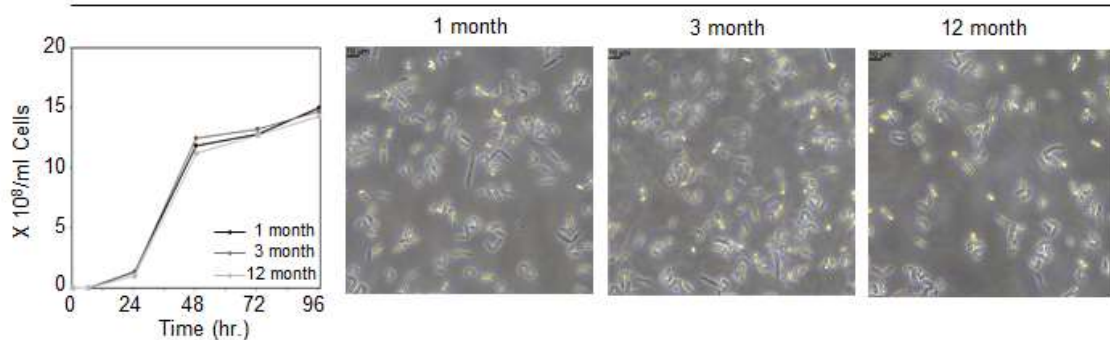
확립된 세포주가 초저온(-196℃)에서 장시간 보관 후에도 성장을 유지하는지를 확인하기 위하여 액체질소에서 1, 3 및 12개월 보관된 갑각류 세 가지 종의 세포를 배양하면서 성장 곡선을 비교함. 아래 그림에서 1, 3 및 12개월 보관된 세포 간에 세포 성장의 차이가 없는 것을 확인할 수 있고, 각 시간별 세포들을 관찰한 결과 세포 모양도 거의 흡사한 형태를 띠고 있음.

## Maintenance of cell growth after long-term Cryopreservation

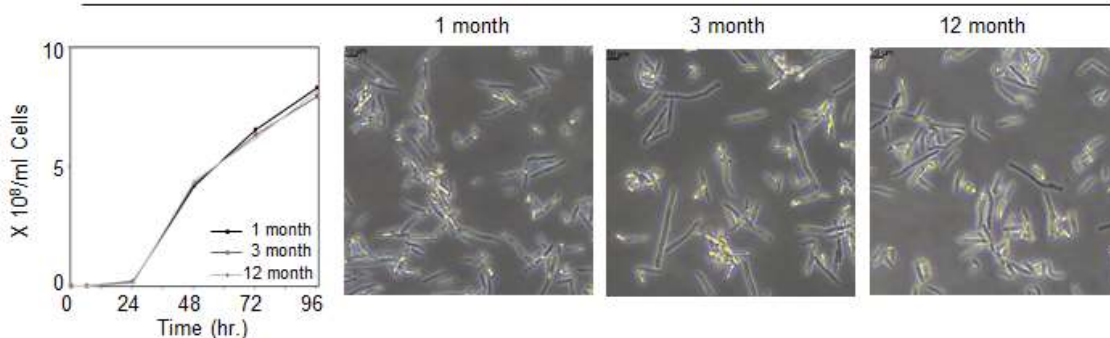
### SHRIMP CELLS



### LOBSTER CELLS



### CRAB CELLS



결과적으로 신청기술에서 갑각류 세 가지 종의 세포를 오랜 기간 배양하더라도 그 특성의 변화 없이 지속적인 성장을 보여주며, 장시간 보관에도 세포의 성장이 유지되어 세포주로 확립된 것을 분명하게 확인함.

## 2. 갑각류(새우, 게 또는 랍스터 등) 세포 맞춤 배양액 개발

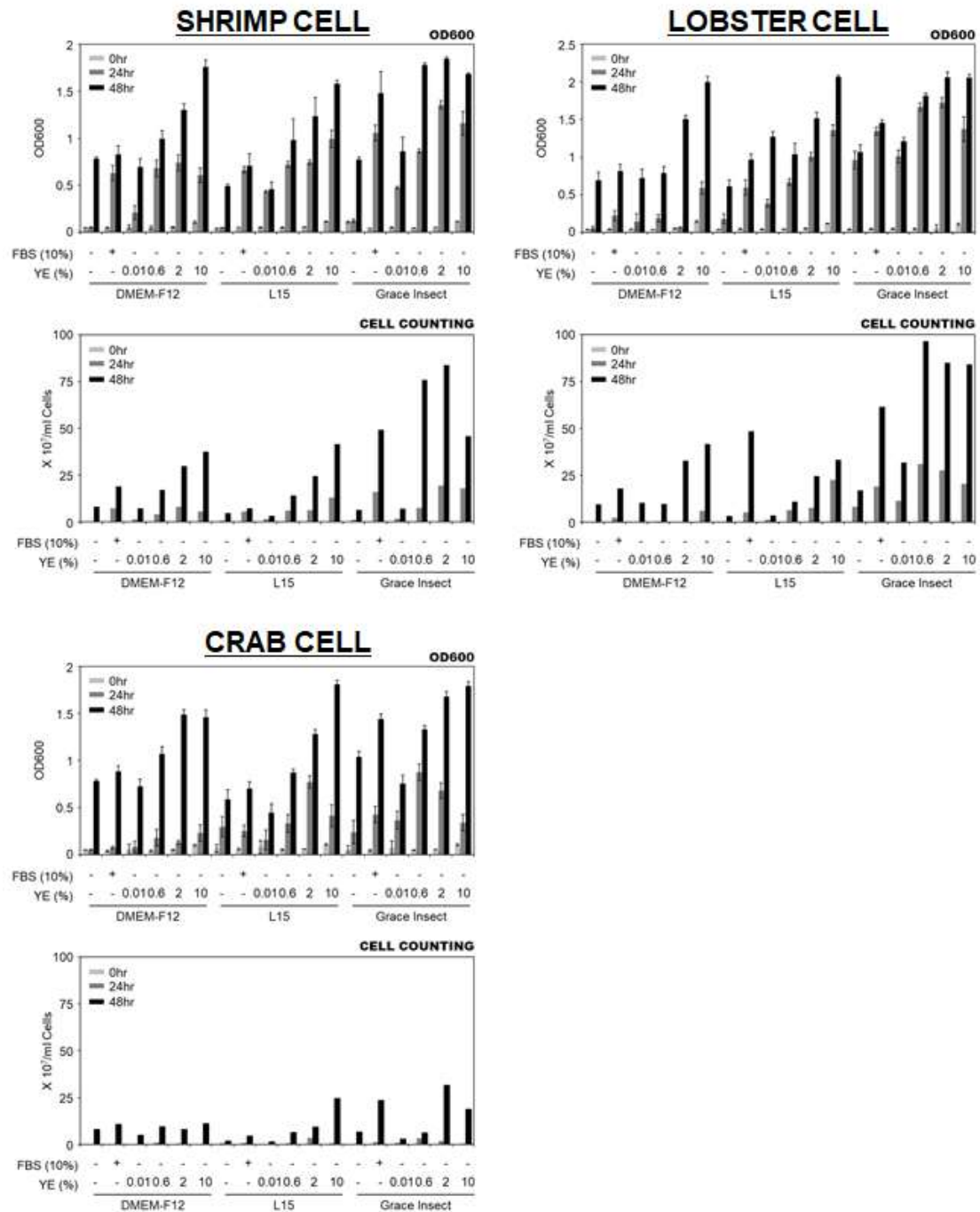
신청기술에서 혈청이 포함되지 않고도 갑각류 세포의 성장 및 증식에 효과적인 갑각류 세포 맞춤 배양액을 최초로 개발함.

### 가. 기본 배지에 효모 추출물이 첨가된 경우

소태아혈청과 같은 혈청배지는 식품으로 사용될 수 없는 성분을 다수 포함할 뿐 아니라 비윤리적이고 상당히 고가이므로 신청기술에서는 무혈청배지로 대체하고, 갑각류 세포가 잘 증식할 수 있는 최적의 무혈청 배지를 개발함.

갑각류 세포의 배양에 있어서 세포 증식 효과가 있는 소태아혈청을 대체할 수 있는 성분으로 효모 추출물

(Yeast extract)이 사용될 수 있는지를 확인하기 위해, 효모 추출물을 첨가한 경우 어떠한 세포 증식의 변화를 보이는지 검토함. 3종류의 기본 배지에 효모 추출물을 첨가하여 배양액을 제조하고, 소태아혈청을 첨가하거나 첨가하지 않은 배양액과 비교함.



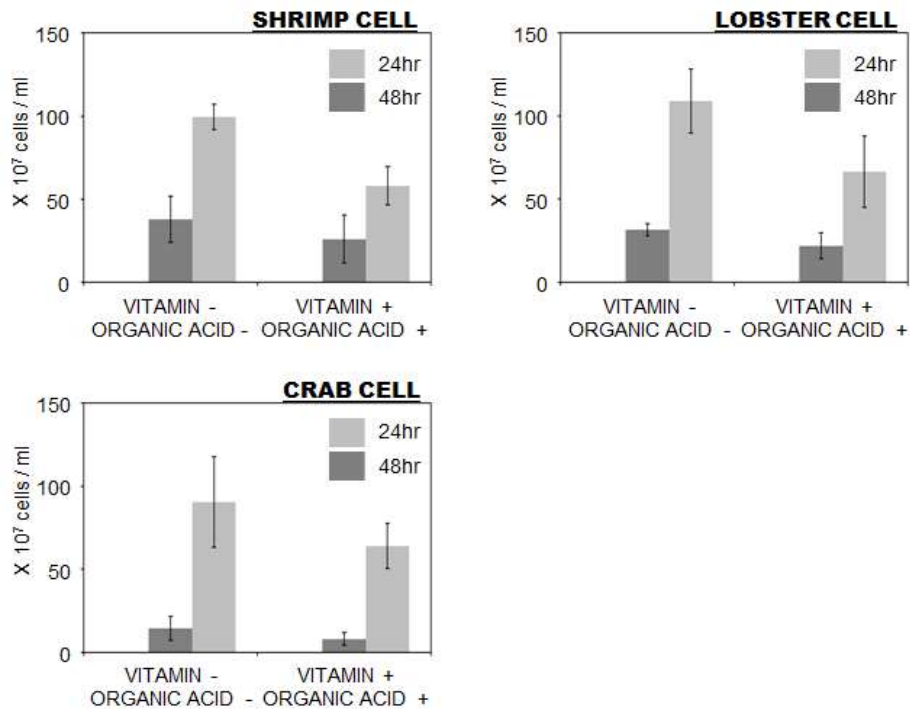
위의 도표에서 Grace's insect media를 기본 배지로 사용하고 효모 추출물을 첨가한 경우 가장 높은 세포 증식률을 보임. 또한, 배지에 효모 추출물을 첨가한 경우 소태아혈청을 첨가한 배지보다 세포 증식에 효과적임을 분명히 확인함.

#### 나. 기본 배지에 비타민과 유기산이 첨가되지 않은 경우

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 검토함.



기본 배지(Grace's insect media, 무혈청)에 효모 추출물을 0.6% 농도로 첨가한 배지 조성물과 기본 배지에 비타민과 유기산을 제거하고 효모 추출물을 0.6% 농도로 첨가한 배지 조성물을 제조하고 갑각류 세포를 배양하여 세포 증식을 관찰함.



위의 도표에서 비타민과 유기산을 첨가하지 않은 배지 조성물에서 배양한 세포가 비타민과 유기산을 첨가한 배지 조성물에서 배양한 세포보다 더 빠르고 높은 증식을 보이며, 유기산에 의해 세포 증식이 저해되는 것을 확인함.

위의 결과들을 종합하면, 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 분명히 파악함.

신청기술에서 혈청 대체 및 성분 교체/제거를 통하여 기존 갑각류 세포 배양액보다 97% 이상 저렴한 배양액을 개발하고, 세포 증식 효율도 크게 향상시킴.

## ■ 기존 기술과의 차별성

### 1. 기존 기술의 문제점

갑각류의 근육 및 지방 세포를 분리하고 배양하는 특허출원 제10-2021-7025815호(현재 특허청 심사중)가 있으나, 상기 특허출원은 ① 유전자를 전달하는 인공적인 외래 인자를 세포에 주입하고, ② 소태아혈청을 사용하며, ③ 세포 증식률에서 큰 차이를 보이는 부착배양을 사용하고, ④ 세포주 확립을 위하여 세포 추출 및 처리하는 어떠한 과정도 소개하지 않는바, 결론적으로 기존 기술로 제작된 세포주의 경우 식품으로 전혀 사용될 수 없는 가장 큰 문제점이 있음.

### 2. 갑각류(새우, 게 또는 랍스터 등)의 식품용 세포주 확립

신청기술에서는 생물학적 또는 화학적 외인성 불멸화 인자를 처리하여 세포의 불멸화를 유도하지 않고도 갑각류의 세포주를 최초로 확립함. 구체적으로, ① 인공적인 불멸화 인자를 전혀 처리하지 않고, ② 소태아혈

청을 전혀 사용하지 않으며, 갑각류 세포의 성장 및 증식에 효과적인 무혈청 배양액을 최초로 개발하고, ③ 세포 증식률이 크게 향상된 부유배양을 사용하며, ④ 세포주 확립을 위하여 세포 추출/분리 및 배양하는 최적의 방법을 개발한바, 매우 뛰어난 증식능력을 보유한 식품용 세포주를 최초로 확립함.

신청기술은 최초이기 때문에 유사한 기존 기술이 아예 없음.

#### 가. 콜라겐 분해효소 처리

일반적으로 세포분리 단계에서 단백질 분해효소를 높은 온도에서 장시간 처리하고 있으나, 단백질 분해효소를 처리할 경우 세포 자체의 단백질도 분해될 수 있는바 세포 추출 효율이 많이 떨어질 수 있음.

신청기술에서는 갑각류 세포에 악영향을 주지 않도록 낮은 온도에서도 활성을 갖고 있는 콜라겐 분해효소를 이용하여 세포를 조직으로부터 분리함. 세포에 영향을 주지 않으면서 조직으로부터 분리할 수 있는 최적의 온도와 처리 시간 등을 자체 연구를 통해 파악함.

#### 나. 순차적 세포 분리

기존에는 세포에 영향을 미칠 수 있는 단백질 분해효소를 장시간 처리하고, 조직으로부터 세포를 단일 체반 사이즈로 분리하고 있으나, 갑각류 세포는 효소, 온도 및 처리 시간에 민감하게 반응하는바, 신청기술에서는 효소에 대한 영향을 줄이기 위하여 순차적 분리 시스템을 적용함.

#### 다. 세포주 제조와 증식을 위한 1차·2차 부유배양 단계

기존에는 대부분 부착배양하였으나, 신청기술에서는 세포주 제조를 위한 1차 부유배양과 세포주 증식을 위한 2차 부유배양으로 구분하며, 기본 배지에서 조직 절편을 제거하고 항생제 첨가량을 달리하는 1차·2차 배양으로 분리함으로써 식품 적합성을 크게 향상시킴과 동시에 10배 이상의 세포수 증가를 달성함.

따라서 신청기술에 의해 확립된 식품용 갑각류 세포주는 ① 식품 제조기준에 부합하고, ② 매우 뛰어난 증식능력을 보여주며, ③ 세포주 확립까지 소요되는 시간이 줄어들고, ④ 장시간 동결보존 후에도 증식능력과 세포의 형태가 유지되는 뛰어난 효과를 나타냄.

### 3. 갑각류(새우, 게 또는 랍스터 등) 세포 맞춤형 배양액 개발

갑각류 배양육을 개발/생산하기 위해서는 세포 맞춤형 배양액의 개발이 반드시 요구됨. 기존에는 세포의 성장과 증식에 매우 효과적인 소태아혈청이 세포배양에서 필수적으로 고려되었으나, 소태아의 혈액에서 추출하는바 매우 비윤리적이고 상당히 고가일 뿐 아니라 식품으로 사용될 수 없는 심각한 문제점이 있음.

신청기술에서 혈청이 포함되지 않고도 갑각류 세포의 성장 및 증식에 효과적인 배양액을 최초로 개발하였고, 무혈청 배양액의 특성 실험을 통하여 갑각류 세포 맞춤형 배양액이 식품용으로 사용될 수 있음.

따라서 신청기술에서 개발된 갑각류 세포 배양용 기본 배지는 비타민을 포함하지 않고, 유기산을 포함하지 않으며, 효모 추출물을 포함하는 것을 특징으로 하여 ① 소태아혈청을 첨가한 기본 배지보다 세포 증식에 효과적이고, ② 아미노산 등을 추가로 첨가하는 경우 세포 증식 속도 및 증식량을 증가시키며, ③ 갑각류 세포 증식이 오히려 저해되는 것을 예방할 수 있고, ④ 혈청 대체 및 성분 교체/제거를 통하여 기존 배양액보다 97% 이상 가격을 낮출 수 있는 현저한 효과를 나타냄.

결과적으로 신청기술인 갑각류 세포 추출, 세포 증식 및 세포 맞춤형 배양액 개발을 통하여 최초로 식품용 갑각류 세포주를 확립하였고, 갑각류 배양육의 개발/생산의 가능성을 열어줌.

## 경제·산업적 파급효과

### 1. 갑각류 배양육의 개발 및 생산 가능

상위 포식자인 갑각류의 경우 많은 양의 유해물질들이 체내에 축적되는데, 유해물질이 없는 청정한 갑각류 배양육에 대한 필요성이 대두되고 있으므로, 확립된 갑각류 세포주를 추가적으로 배양하여 갑각류 배양육을 개발 및 생산 가능하고, 특히 양식이 불가능한 독도 새우 등의 배양육을 개발 및 생산하는 경우 가격 안정화와 대량 공급에 엄청난 도움이 될 것임.

### 2. 유전자원 보존 및 복원 가능



독도 새우로 알려진 3종의 새우들은 현재까지 양식이 불가능하여 종 보존에 대한 노력으로 위의 사진과 같이 치어들을 독도 인근에 방사하고 있음. 신청기술로 독도 새우 세포주를 확립하여 유전자원 보존 및 복원의 기틀을 마련할 수 있음.

### 3. 환경 파괴 예방

새우를 양식하기 위하여 맹그로브 숲이 파괴되고 있으며, 이는 환경오염이라는 악순환으로 이어지고 있음. 신청기술을 통하여 환경을 파괴하지 않고 갑각류를 안정적으로 생산할 수 있는 새로운 대안을 제시할 수 있어서 환경 보전에 엄청난 기여가 기대됨.

### 4. 세포 배양액 및 세포배양식품 시장의 선점

신청기술로 세포주를 확립하고 세포 맞춤 배양액을 저렴한 비용으로 개발할 수 있으므로, 기존의 세포주 및 배양액이 가지고 있던 다양한 문제점을 획기적으로 개선하였는데, 미래 세포 배양액 및 세포배양식품 시장을 선점할 수 있음.

## 지식재산권 및 시험성적

#### ■ 지식재산권

국내 특허		해외 특허		기타(실용신안, 상표, 디자인 등)	
출원: 4건	등록: 3건	출원: 1 건	등록: 건	출원: 건	등록: 건
구분	출원번호 (등록번호)	출원일자 (등록일자)	출원명칭 (등록명칭)	출원인 (권리자)	
특허	10-2022-0121026 (10-2636615)	2022.09.23 (2024.02.07)	비-인간 동물 세포주의 제조방법, 이에 따라 제조된 세포주 및 세포주의 배양방법	셀미트 주식회사	
특허	10-2022-0121025 (10-2626827)	2022.09.23 (2024.01.15)	동물세포 배양용 배지 조성물 및 이를 이용한 동물세포의 배양방법	셀미트 주식회사	
특허	10-2023-0020437 (10-2608766)	2023.02.16 (2023.11.28)	동물세포 배양용 배지 조성물 및 이를 이용한 동물세포의 배양방법	셀미트 주식회사	

#### ■ 시험성적

시험기관:

시험내용:

시험결과:

