

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개()발간등록번호(O)

고부가가치식품기술개발사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003499-01

고부가 식품소재 개발을 위한 배양돈육 생산 기반기술 확립

2021.05.06.

진바이오텍 강정선
서울대학교 이창규
서울대학교 조철훈

농 립 축 산 식 품 부
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “고부가 식품소재 개발을 위한 배양돈육 생산 기반기술 확립” (개발기간 : 2018. 04. 30 ~ 2020. 12. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2021. 05. 06.

주관연구기관명 : (주)진바이오텍 강 정 선

협동연구기관명 : 서울대학교 이 창 규

협동연구기관명 : 서울대학교 조 철 훈



주관연구책임자 : 강 정 선

협동연구책임자 : 이 창 규

협동연구책임자 : 조 철 훈

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	118042-03	해 당 단 계 연 구 기 간	2018.04.30 ~ 2020.12.31	단 계 구 분	3/3
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	고부가가치식품기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	고부가 식품소재 개발을 위한 배양돈육 생산 기반기술 확립			
연구책임자	강 정 선	해당단계 참여연구원 수	총: 30명 내부: 29명 외부: 1명	해당단계 연구개발비	정부: 260,000천원 민간: 87,000천원 계: 347,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 46명 내부: 43명 외부: 3명	총 연구개발비	정부: 735,000천원 민간: 246,000천원 계: 981,000천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)진바이오텍 서울대학교 서울대학교			참여기업명: (주) 진바이오텍	
국제공동연구	상대국명: 해당 없음			상대국 연구기관명: 해당 없음	
위탁연구	연구기관명: 세종대학교			연구책임자: 박 성 권	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반 「국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제24조의 4에 해당하지 않음
-------------------------	--

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호	Y	Y	Y	N	Y	N	N	N	Y	N	N

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)

보고서 면수
98

- 고부가 식품소재 개발을 위한 세포 배양기술 활용 배양돈육 생산 및 산업화 기반기술 확립
 - 돼지 근육세포 배양 기술 최적화 및 대량 생산 기반 확보
 - 돼지 줄기세포의 근육 및 지방세포 분화 및 배양 기술 개발
 - 배양돈육 모델 설정 및 근육세포와 배양돈육의 특성 분석
- 주요 연구개발 성과
 - 배양돈육 시제품 1건
 - 돼지 줄기세포의 근육 및 지방세포 분화 및 배양 기술 확립
 - 돼지 근육세포 배양 기술 확립
 - 배양돈육 대량 생산을 위한 기초공정 확립
 - 돼지 배아줄기세포 배양 기법 개발 및 특성화 작업
 - 돼지 배아줄기세포의 근육유도분화 기법 개발
 - 근육 분화에 관여하는 인자 발굴
 - MYOD1 과발현을 통한 섬유아세포의 근육교차분화 기법 개발
 - 돈육 부위별 소비자 선호 외관 모델 확립
 - 품종 및 성별에 따른 근육위성세포 차이 분석
 - *In vitro* 근육위성세포 안전성 확인 및 배양 근섬유 특성 분석
 - 특허출원 3건, 특허등록 1건, 고용창출 2명
 - SCI 논문 10편, 비SCI 논문 2편, 학술발표 19건, 인력양성 6명, 홍보전시 5건

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>○ 고부가 식품소재 개발을 위한 세포 배양기술 활용 배양돈육 생산 및 산업화 기반기술 확립</p> <ul style="list-style-type: none"> - 돼지 근육세포 배양 기술 최적화 및 대량 생산 기반 확보 - 돼지 줄기세포의 근육 및 지방세포 분화 및 배양 기술 개발 - 배양돈육 모델 설정 및 근육세포와 배양돈육의 특성 분석 																																						
<p>연구개발성과</p>	<p><예상되는 연구개발성과 유형></p> <table border="1" data-bbox="432 533 1457 696"> <thead> <tr> <th rowspan="2">구분</th> <th rowspan="2">논문</th> <th rowspan="2">특허</th> <th rowspan="2">보고서 원문</th> <th rowspan="2">연구 시설 · 장비</th> <th rowspan="2">기술 요약 정보</th> <th rowspan="2">소프트 웨어</th> <th rowspan="2">화합물</th> <th colspan="2">생명자원</th> <th colspan="2">신제품</th> </tr> <tr> <th>생명 정보</th> <th>생물 자원</th> <th>정보</th> <th>실물</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>예상성과 (N/Y)</td> <td>Y</td> <td>Y</td> <td>Y</td> <td>N</td> <td>Y</td> <td>N</td> <td>N</td> <td>N</td> <td>Y</td> <td>N</td> <td>N</td> </tr> </tbody> </table> <p>○ 주요 연구개발 성과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 배양돈육 시제품 1건 - 돼지 줄기세포의 근육 및 지방세포 분화 및 배양 기술 확립 - 돼지 근육세포 배양 기술 확립 - 배양돈육 대량 생산을 위한 기초공정 확립 - 돼지 배아줄기세포 배양 기법 개발 및 특성화 작업 - 돼지 배아줄기세포의 근육유도분화 기법 개발 - 근육 분화에 관여하는 인자 발굴 - MYOD1 과발현을 통한 섬유아세포의 근육교차분화 기법 개발 - 돈육 부위별 소비자 선호 외관 모델 확립 - 품종 및 성별에 따른 근육위성세포 차이 분석 - <i>In vitro</i> 근육위성세포 안전성 확인 및 배양 근섬유 특성 분석 - 특허출원 3건, 특허등록 1건, 고용창출 2명 - SCI 논문 10편, 비SCI 논문 2편, 학술발표 19건, 인력양성 6명, 홍보전시 5건 											구분	논문	특허	보고서 원문	연구 시설 · 장비	기술 요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신제품		생명 정보	생물 자원	정보	실물	예상성과 (N/Y)	Y	Y	Y	N	Y	N	N	N	Y	N	N
구분	논문	특허	보고서 원문	연구 시설 · 장비	기술 요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신제품																													
								생명 정보	생물 자원	정보	실물																												
예상성과 (N/Y)	Y	Y	Y	N	Y	N	N	N	Y	N	N																												
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>○ 활용계획</p> <ul style="list-style-type: none"> - 배양육 시장 개척 및 대체육 구현 식품소재 개발 - 배양육을 이용한 유아식, 환자식, 노인식 전용 식품 개발 - 배양돈육 기술을 활용한 타 축종 배양육 제품 개발 - 근육 분화 기술을 통한 근육성 질환 모델 개발 등 생명공학기술 활용 확대 <p>○ 기대효과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 미래 단백질 안보 문제에 선제 대응 및 국내 식량 자급력 향상 - 동물복지 및 환경문제를 고려한 지속 가능한 녹색 축산의 실현 가능성을 제고 - 생명공학을 활용한 고부가 식품소재 생산의 기준 제시 - 육류 생산 및 소비에 대한 새로운 패러다임 제시 - 식품안전성과 소비자 니즈를 만족시키는 육제품 생산 가능 																																						
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	배양육	돈육	식품소재	근육세포	돼지 줄기세포																																		
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	Cultured meat	Pork	Food materials	Muscle cells	Pig stem cells																																		

<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	9
2. 연구수행 내용 및 결과	16
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	97
4. 연구결과의 활용 계획 등	100
붙임. 참고문헌	101

<별첨 1> 연구개발보고서 초록

<별첨 2> 자체평가의견서

<별첨 3> 연구성과 활용계획서

<본문작성 양식>

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

- 고부가 식품소재 개발을 위한 세포 배양기술 활용 배양돈육 생산 및 산업화 기반기술 확립
 - 돼지 근육줄기세포 배양
 - 돼지 근육줄기세포 배양 기술 최적화 및 대량 생산 기반 확보
 - 돼지 줄기세포의 근육 및 지방세포 분화 및 배양 기술 개발
 - 배양돈육 모델 설정 및 근육세포와 배양돈육의 특성 분석

1-2. 연구개발의 필요성

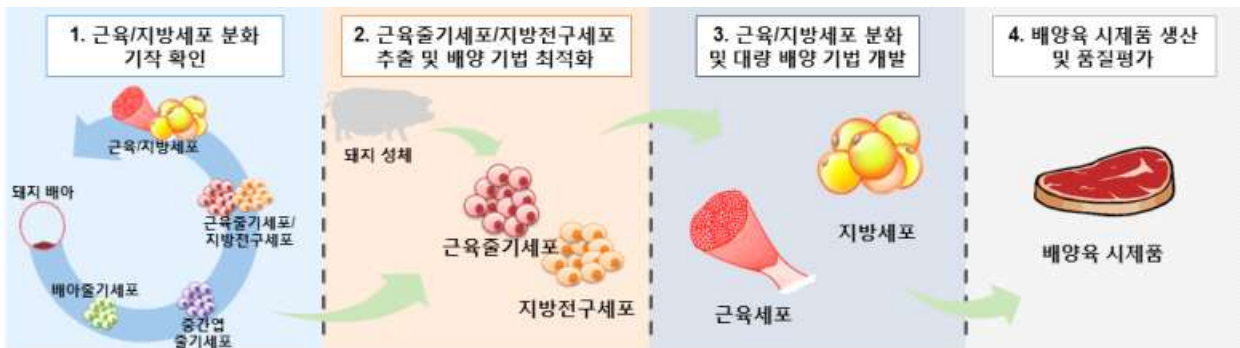


그림 1. 연구 개발 개요

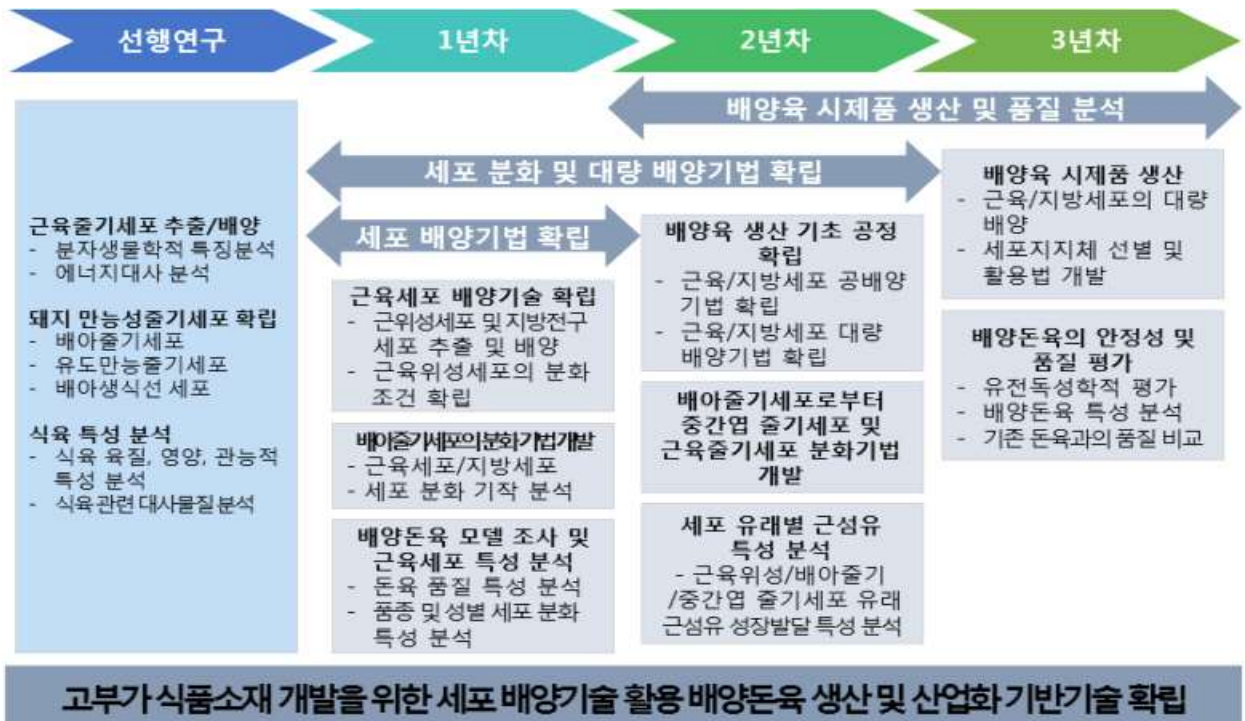


그림 2. 전체 연구 흐름도

○ 육류는 인체에 꼭 필요한 단백질 공급원으로서 매년 소비량이 전 세계적으로 증가하고 있음 (그림 3)

- 인체는 성장과 유지를 위해 끊임없이 단백질을 필요로 하며, 체내에서 합성하지 못하는 필수 아미노산은 반드시 음식물 섭취를 통해 공급해야만 함
- 동물성 단백질은 그 아미노산 조성이 인체의 근육 단백질을 구성하는 아미노산과 유사하여 체내에서 대사에 활용하기 용이함(장, 2002)
- 육류 소비는 영양적인 이유와 더불어 경제 성장에 의한 식품 기호성의 변화에 따라 세계 인구 증가와 함께 계속적으로 증가하고 있으며, 국내에서도 마찬가지로 경향을 나타내고 있음
- 국내의 경우 2014년 기준 연간 육류 소비량이 42.7 kg에 이르며, 이 중 돼지고기가 20.9 kg으로 가장 많은 부분을 차지하고 있음

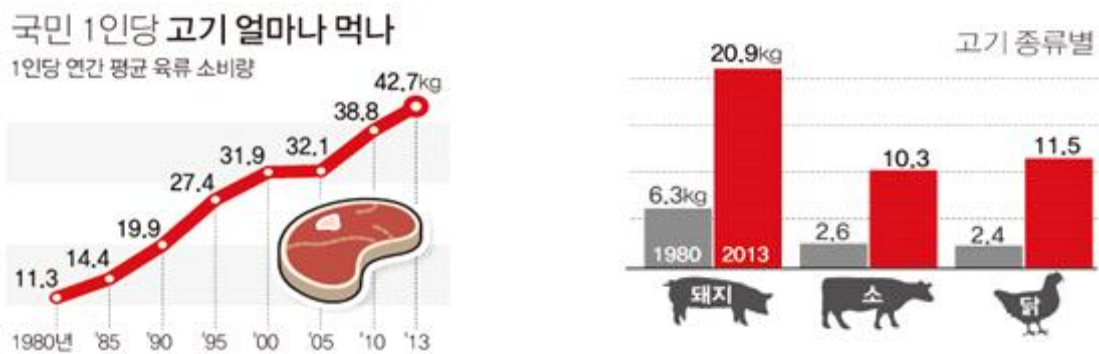


그림 3. 국내 육류 소비 변화

자료: 농림축산식품부, 2014

○ 인구 급증, 기후 변화(온난화) 등의 이유로 인하여 미래 식량 안보의 문제가 대두되고 있고 이러한 문제를 야기하는 주요 원인으로 전통 축산업이 지목되고 있음(그림 4)

- 유엔은 전 세계 인구가 2016년 현재 74억 명에서 2050년 90억 명 이상이 될 것으로 전망
- 인구 증가에 따른 축산물 수요는 2050년 약 5.5억 톤까지 증가할 것으로 예측됨. 돼지고기 소비량은 이 중 약 1.4억 톤(총 소비량의 25%)에 해당할 것으로 예상
- 축산에서 발생하는 온실가스 생산량은 전체의 16% 가량을 차지하고 있으며, 육류 1 kg 당 소 고기의 경우 14.8 kg, 돼지와 닭은 각각 3.8 kg, 1.1 kg의 이산화탄소(CO₂)가 생산됨. 온난화지수가 높은 이산화질소(NO₂)와 메탄(CH₄)도 온실가스 중 각각 60%와 30% 정도 차지하고 있어 지구 온난화에 미치는 영향이 다른 산업에 더 크다고 주장하고 있음(Steinfeld 등, 2006)
- 가축 생산을 위해 전 세계 이용가능 농지의 70%가 사용되고 있으며, 육류 1 kg을 얻기 위해 곡물 약 6 kg이 공급됨. 식수의 제공 및 분뇨처리를 위해 평균 15,000 L의 물이 소요되며 이는 인간이 하루에 사용하는 양의 수배에 이르는 수준임 (FAO, 2006)
- 현재 지속가능한 축산을 목표로 하여 메탄가스 저감화, 가축분뇨자원화 및 바이오에너지 생산 등의 연구개발과 산업적용이 활발히 진행되고 있으나 증가하는 축산물 수요를 현 시스템으로 온전히 감당하기에 어려운 실정임

What It Takes To Make A Quarter-Pound Hamburger

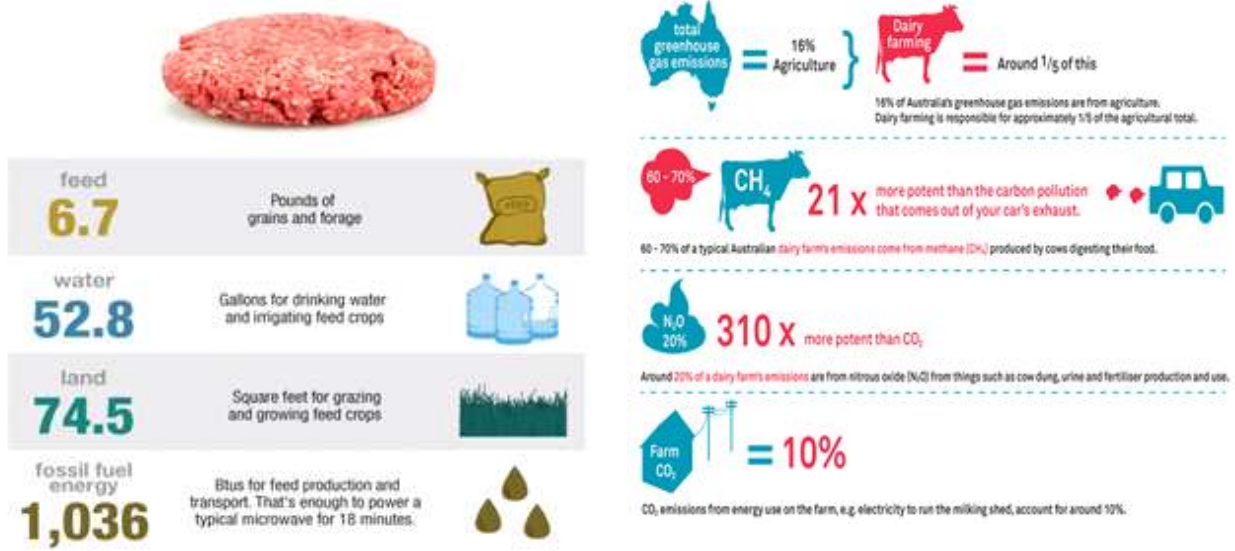


그림 4. 식육 생산 시 소요되는 자원 및 환경 문제

자료: Capper, 2011; Christie 등, 2008

- 증가하는 육류의 수요와 전통축산업이 가지는 불가피한 한계를 동시에 극복할 수 있는 대체 단백질(식물성 고기, 식용곤충, 배양육 등; 그림 5)이 등장하고 있음
 - 미래 육류 가격의 급등이 예상됨에 따라 이러한 대체 단백질 등장은 경제적인 단백질 공급원으로서 필수적임
 - 식물성 대체 단백질이란 콩과 같은 단백질 함량이 높은 곡물을 통해 육류의 맛과 식감을 모방하는 식품을 이야기함
 - 최근 미국 Impossible Foods는 햄단백질을 첨가하여 지금까지의 품질과는 차원이 다른 식육과 비교하여 맛이나 물성이 유사한 햄버거 패티를 출시하여 뉴욕의 레스토랑을 시작으로 판매점을 크게 확대하고 있음
 - Beyond Meat의 냉동패티의 경우 Walmart나 Whole Foods와 같은 식료품점으로 저변 확대되고 있음
 - 곤충은 전 세계적으로 130만 종이 서식하며 전체 생물군의 70% 이상인 지상 최대의 생물자원임(이 중 약 2,000 종 정도가 식용 가능). 또한, 단백질, 비타민, 필수 아미노산 등의 영양소는 풍부한 반면에 지방의 함량은 적어 이상적인 영양소 공급이 가능함
 - 곤충의 경우 사료 효율이 80% 정도로 높고 분뇨나 온실가스 발생률이 소나 돼지에 비해 낮기 때문에 식육을 대체할 중요한 육류 대체 단백질 소재로 주목받고 있음
 - 그러나 곤충의 생산 체계 확립이 되어 있지 않아 무게 당 단가가 비싼 편이며 외형이나 식감, 소비자의 거부감(곤충 혐오증) 때문에 현재까지 식품으로서의 수용성이 높지 않음. 전 세계적으로 식용곤충을 소비하는 나라들이 많지 않고 우리나라의 경우 토종 식용곤충 종이 거의 없음
 - 배양육의 경우 동물 유래 세포를 이용하여 실험실 내에서 배양을 통해 생산하는 방식으로 가축을 사육할 때 발생하는 환경 문제 없이 가장 유사한 형태로 식육을 생산할 수 있음. 생산 소요 자원이나 점유 면적의 감소, 동물복지 및 도살 과정이 불필요하여 식육의 섭취를 제한하는 채식주의자 혹은 종교인에게 제공 가능할 것으로 예상됨



식물성 고기



식용곤충



배양육(닭고기)

그림 5. 상업화가 진행 중인 식육 대체 단백질 식품

- 배양육은 유일한 동물성 단백질 기반 식품으로 i) 지속가능하며 안전한 시스템, ii) 질감, 조성, 그리고 향미의 조절이 가능, iii) 식중독 질병의 제어가 가능, iv) 가축의 열악한 생존 조건이 감소되는 등의 장점들이 있음
 - 건강기능성이 우수한 육류의 생산이 가능함. 배지 조성 and 배양조건을 조절하여 지방이나 지방산의 함량을 조절하거나 지방산 조성을 개인의 균형에 맞게 바꿀 수 있음
 - 가축 사육밀도의 조절을 통한 동물복지 구현으로 동물의 생명과 사육환경의 보호가 가능
 - 육류 생산 소요 면적과 생태 점유면적이 감소하여 인구 증가에 따른 육류 요구량 대응가능
 - 전통 축산에 비해 생산기간이 단축되어 실험실 조건에서 약 6주 내에 육류의 제조 가능
 - 인위적인 배양 환경 조절에 의해 동물의 자체 활동으로 소모되는 영양분과 에너지의 소실이 없어서 영양분과 에너지의 효율적 전환이 가능
 - 희귀하거나 이국적인 육류의 생산이 가능하여 새로운 육류에 대한 소비 창출이 가능함
 - 배양생산 과정 제어가 가능하여 독성물질이나 병원균의 오염을 차단하여 안전한 육류 생산이 가능

표 1. 대체육류별 특징과 장·단점

	식물성 고기	식용곤충	배양육
특징	식물성 원료를 이용하여 제조	곤충 이용	실제 식육 제조
장점	채식주의자 이용 가능 종교적 제한이 없음 동물복지 증진	소재의 다양성	채식주의자 이용 가능 종교적 제한이 없음 식중독 제어 가능 동물복지 증진 고부가 식품소재
한계점	식물성 단백질 기반 식육 유사식품	소비자 거부감 (곤충혐오증)	안전성에 대한 우려
국내 연구현황	상품화	상품화	없음 (국외: 상품화 진행 중)

○ 향후 10년 내 배양육이 전 세계적으로 대중화될 것으로 보고되고 있으나, 관련 기술을 보유한 국내 연구진은 거의 전무한 실정임

- 배양육(cultured meat, lab-grown meat, In vitro meat)은 1999년 Willem Van Eelen이 기술 개발을 시작하였고, 2012년 전 세계 30여개의 연구실에서 연구를 진행하고 있음
- 2013년 Mark Post 연구팀이 주관하여 소고기 패티의 형태로 소비자를 대상으로 한 관능평가를 진행하였음(융합연구정책센터, 2016)
- 2017년 Memphis meats 닭고기 배양육 생산에 성공하여 시식행사를 진행하였음
- 2017년 9월, 국내 MBG 기업부설연구소에서 배양육과 관련된 ‘버섯 농축액과 배양액을 이용한 패티제조방법’이라는 명칭의 동물 세포 배양 특허를 국내 최초로 출원하였음
- 배양육 생산 기술은 환경보전, 식품안전, 식품안보, 가축전염병 및 동물복지 등 현재 축산시스템의 당면 문제와 인구증가에 따른 식육 수요 증가의 딜레마를 해결할 주요 대안(그림 6)

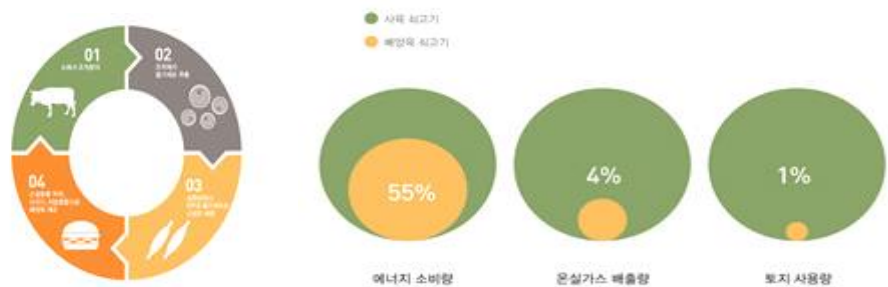


그림 6. 소고기 배양육의 생산 및 특징

자료: 융합연구정책센터, 2016

- 국내 천연자원, 토지 및 에너지 등을 고려할 때 증가하는 축산물 수요를 현 축산시스템과 공존하며 해결이 가능함
- 네덜란드, 호주, 미국 등에서는 현 축산시스템으로 수용하지 못하는 축산물 요구를 충족시킬 수 있는 단백질 대체 식품 개발 방법으로 인지하여 정부 차원의 지원을 받아 연구를 진행하고 있음
- 건강과 관련하여 헴철 성분, 포화지방산, 콜레스테롤 등을 없애거나 줄이고 비타민, n-3지방산 등을 높인 디자인된 식육 생산 또는 단백질 소재의 생산이 가능함
- 따라서, 배양육 생산 기술은 미래 식량안보기술로서 국내에서도 보유가 필요한 기술이라고 사료되나 현재 국내에서는 해당 기술에 대해 연구하고 있는 대학 및 연구 시설이 거의 전무한 상태임

○ 본 기술 개발을 통해 환경과 동물복지 측면에서 축산농가에 직간접적으로 도움이 될 수 있음

- 현재 우리나라 축산 환경은 더 이상의 양적 성장을 이루기 매우 어려운 구조이며, 게다가 동물복지에 대한 소비자의 압력은 오히려 축산 생산량이 줄어들고 축산물 가격이 높아지는 현상이 앞으로 지속될 것으로 예상됨
- 그러나, 소비자가 용인할 수 있는 축산물 가격이나 환경부담 수준을 넘게 되면 우리나라 축산을 포기할 수밖에 없는 상황으로 갈 수 있어 미래 식량안보에 큰 위협이 될 수 있음
- 따라서, 현재 축산 농가와 상생하면서 환경부담, 동물복지를 확보할 수 있는 기술이 배양육 생산기술이라고 판단됨
- 아울러 본 연구에서 개발되는 기술은 신선육 시장을 대체하기보다는 식품소재, 식품첨가물 및 기능성 식품과 같은 전통 축산물 시장의 외연을 확대에 기여할 수 있을 것으로 기대됨

1-3. 연구개발 범위

○ 최종목표

- 고부가 식품소재 개발을 위한 세포 배양기술 활용 배양돈육 생산 및 산업화 기반기술 확립

○ 세부목표

<주관연구기관 (주)진바이오텍>

- 돼지 근육위성세포 및 지방전구세포 추출 및 배양기법 확립
- 돼지 근육위성세포 및 지방전구세포의 성장 및 분화 조건 확립
- 조직별 세포의 기능적/구조적 특성 분석
- 근육과 지방세포의 동시배양 기법 확립
- 배양돈육 생산 최적화를 위한 세포배양액 최적화
- 근육위성세포기반 배양돈육 시제품 개발

<제1협동연구기관 서울대학교>

- 돼지 배아줄기세포주를 이용한 근육/지방 세포 분화
- 중간엽 줄기세포 및 근육 줄기세포 분리 및 분화 유도 기술 확립
- 세포 지지체를 활용한 배양육 생산 및 특성 분석

<제2협동연구기관 서울대학교>

- 배양돈육 모델 조사 및 품종별/조건별 근육위성세포 분화 특성 분석
- 세포 유래 유형별 근섬유 특성 분석
- 배양돈육의 특성, 안전성 및 품질 평가

○ 연차별 목표

연 차	목 표	세부연구 목표
1차년도 (2018)	○ 근육세포 배양기술 확립	○ 돼지 근육위성세포 및 지방전구세포의 추출기법 확립 및 추출세포 특성분석
		○ 돼지 근육위성세포의 배양 조건 확립
	○ 돼지 배아줄기세포주를 이용한 근육/지방 세포 분화	○ 돼지 배아줄기세포주를 이용한 근육 세포분화
		○ 돼지 배아줄기세포주를 이용한 지방 세포분화
○ 배양돈육 모델 조사 및 조건별 근육위성세포 분화 특성 분석	○ 돈육 부위별 근섬유 조성 및 지방 분포에 의한 품질 특성 분석	
	○ 품종과 성별 조건에 의한 근육위성세포 분화 특성 분석	
2차년도	○ 배양육 생산을 위한	○ 근육과 지방세포의 동시배양 기법 확립

(2019)	기초공정 확립	○ Microcarrier를 이용한 3D 세포배양 기법 확립
	○ 중간엽 줄기세포 및 근육 줄기세포 분리 및 분화 유도 기술 확립	○ 중간엽 줄기세포 및 근육줄기세포 분리 및 분화 기법 개발 ○ 배양 및 분화 유도
	○ 세포 유래 유형별 근섬유 특성 분석	○ 분화된 근섬유의 유형 및 특성 분석
3차년도 (2020)	○ 배양육 시제품 생산 및 최적화	○ 배양육 대량생산을 위한 세포배양액 최적화 ○ 근육위성세포 기반 배양돈육 시제품 개발
	○ 세포 지지체를 활용한 배양육 생산 및 특성 분석	○ 다양한 줄기세포로부터 배양육 생산 ○ 세포 지지체 선별 및 활용법 개발
	○ 배양돈육의 안전성 및 품질 평가	○ <i>In vitro</i> 배양돈육 안전성 평가 ○ 근육위성세포 기반 배양돈육 품질 평가
최 종	○ 고부가 식품소재 개발을 위한 세포 배양기술 활용 배양돈육 생산 및 산업화 기반기술 확립	

2. 연구수행 내용 및 결과

2-1. 연구내용 및 방법

<주관연구기관 (주)진바이오텍>

[1년차]

○ 돼지 근육위성세포 및 지방전구세포의 추출기법 확립 및 추출세포 특성분석

- 조직에서의 근육위성세포 및 지방전구세포 분리 기법 확립 및 최적화
- 근육위성세포 추출을 위해 2주령 자돈을 준비하여 안락사 시킨 후 뒷다리에서 *Biceps femoris* 근육을 분리·적출하였음(그림 7)

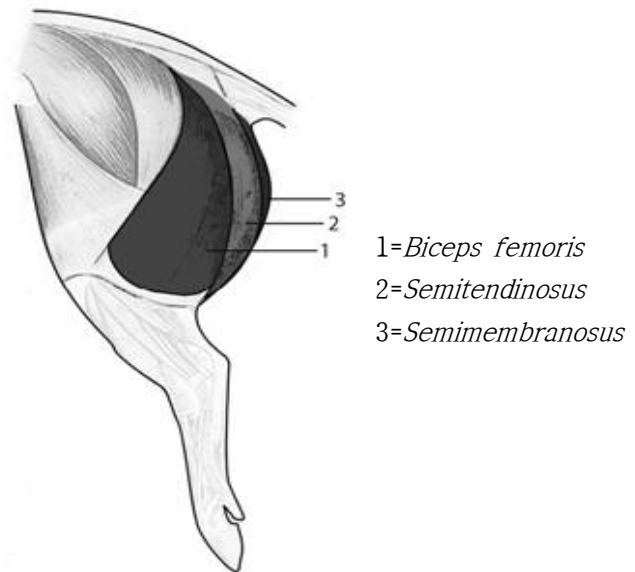


그림 7. 자돈 안락사(좌) 및 뒷다리 근육 모식도(우)

- 오염을 방지하기 위해 채취한 근육조직을 4℃의 항생제(2X anti-biotics-antimycotic, 이하 AA, Gibco, Waltham, MA, USA)가 첨가된 Dulbecco's phosphate-buffered saline(이하 DPBS, WELGENE Inc., Gyeongsan, Korea) 용액에 넣어 클린벤치로 운반하였으며 이후 실험은 멸균된 조건으로 진행하였음
- 이후 분쇄한 조직을 50-mL 효소와 배양액을 첨가하고 incubator 37℃에서 배양하였음. 효소 처리가 끝난 조직을 원심분리 하여 상층액을 버리고 펠렛을 다시 DPBS을 넣어 혼합한 후 다시 원심분리 하였음. 그 후 가라앉아있는 펠렛을 AA가 포함된 MEM 용액에 희석하여 원심분리 후 상층액을 모으는 과정을 2회 반복하였고, 상층액을 다시 원심분리하여 가라앉은 펠렛을 배양액 과 혼합하여 필터링해 여과액을 분주해 이에 10%가 되도록 DMSO를 첨가하여 freezing container에 담아 -70℃에 냉동 보관하였음
- 지방전구세포를 추출하기 위해 2주령 자돈의 등지방을 적출(8-10 g) 하였으며, 이를 가위로 잘게 세절하여 효소를 첨가하여 37℃ 항온수조에서 방치하였음. 그 후 nylon screen으로

여과 후 원심 분리하였고, 가라앉은 펠렛을 PBS에 섞고 다시 원심분리하여 가라앉은 펠렛을 배양액과 혼합하여 필터링 후 여과액을 cryovial에 분주해 freezing container에 담아 -70°C에 냉동 보관하였음

- 근육위성세포와 지방전구세포 추출 후 냉동기법 최적화
 - 관행적으로 세포 동결보호제로 쓰이는 DMSO와 시중에 판매되고 있는 제품들의 세포 사멸율을 비교하였음
- 추출된 세포의 성장발달 특성(세포수율, 성장률, 분화율) 분석
 - 냉동된 vial을 37°C 항온수조에서 해동한 후 가온한 MEM에 10% FBS를 가한 배양배지와 섞은 후 원심분리하여 가라앉은 펠렛을 배양배지와 섞어 culture flask에 분주하였음. 분주된 세포는 37°C CO₂ incubator에 배양하였으며 분주 24시간 후 배지를 교체하였고. 그 후 배지는 48시간 마다 교체하였음
 - 세포가 일정수준 이상 자란 뒤(80% 이상 Confluent) 세포를 미리 37°C 항온수조에서 데운 PBS로 washing 한 뒤 Trypsin 처리하여 배양 후 배지를 첨가해 trypsin의 활성을 중지시켰음. 그 후 원심분리하여 상층액을 제거한 후 가라앉은 펠렛을 계대배양을 하였음. 세포 동결을 할 경우 원심분리가 끝난 펠렛을 배지와 섞은 후 10%가 되게 DMSO를 첨가하여 cryovial에 분주하여 freezing container에 넣어 deep freezer에서 동결하였음
 - 세포의 상태를 일정하게하기 위해 계대배양하기 전, 세포의 개수를 counting 하여 plate에 분주되어질 세포의 수가 일정하게 하였으며, 원심분리된 세포에 배지 10 mL을 혼합하여 잘 풀어준 후 세포가 포함된 배지 10 µL와 trypan blue 용액 10 µL를 섞은 후 hemocytometer에서 세포를 계수하였음. 세포 수를 셀 때 trypan blue에 의해서 활성이 없는 세포는 푸르게 염색되므로 개수에 포함하지 않았고 분주될 세포의 양은 6 well 2×10⁵/well 의 세포를 분주하였음
 - Cell doubling time 또는 population doubling time(PDT)은 세포의 성장속도가 두 배가 되는 데 필요한 평균 시간으로 24시간 동안 세포가 증식되는 숫자를 일주일간 count하여 성장 곡선을 그리고 다음과 같은 공식으로 PDT를 구하였음

$$PDT = \frac{\text{duration} \times \log(2)}{\log(\text{final concentration}) - \log(\text{initial conc.})}$$

- 세포분화 및 분석조건 확립
 - 약 90% 이상 confluent하게 자란 근육위성세포에 분화배지를 이용하여 분화를 유도하였음
 - 배양된 근육세포의 morphology 관찰을 위해서 세포의 핵에 giemsa 염색을 하였음. 근육 세포를 PBS로 washing한 후 100% MeOH를 처리하여 세포를 고정시켜 완전히 건조하고, 고정된 셀의 단분자층에 giemsa stain solution을 30분간 처리하였음. 이후 증류수로 세포 핵 외의 염색이 탈색되도록 세척한 후 현미경으로 관찰하였음
 - 지방세포의 경우 proliferation 3일째 약 90% 정도 confluent하게 분열 후 분화배지(분화 1-5일: 배양배지 + 0.5 mM dexamethasone, 3-isobutyl-1-methylxanthine, 1 µM dexamethasone, 1.7 µM insulin /분화 6-7일 : 배양배지 + 1 µM dexamethasone+ 1.7 µM

insulin/ 분화 8-9일: 배양배지+1.7 μ M insulin)로 교체해서 분화를 유도하였음

- 지방전구 세포의 형태와 세포 내 지방적 형성 상태를 분석하기 위해 Oil-red-O 염색법을 이용하였음. 0.7 g의 Oil-red-O 파우더를 200 mL 100% isopropanol에 한 시간 가량 녹여서 filtering한 후 3차 증류수와 4:6 비율이 되도록 한 번 더 섞어주고 filtering하여 Oil-red-Oil working solution 제작하였으며. 지방세포 분화 후 PBS로 washing 하고, 10% formalin을 첨가하여 5분간 고정 후, 60% isopropanol로 washing 하고 plate를 상온에서 건조시켰다. 건조 후 Oil-red-O working solution을 넣어주고 1시간 동안 은박지를 씌어 염색한 후에 증류수를 이용하여 염색약이 사라질 때까지 washing한 후 현미경으로 관찰하였음

○ 돼지 근육위성세포의 배양 조건 확립

- 적색/백색근 유래 근육위성 세포의 분화유도 및 분화성상 포함 세포생물학적 특성 분석
- 돼지 근육조직 중에서 백색근과 적색근에서 추출된 근육세포의 분화성상을 비교분석하기 위해 6주령 돼지의 *Semitendinosus*(ST) 근육을 적출하여 백색근과 적색근으로 분리하여 근육위성세포를 추출해 배양하였음(그림 8)



그림 8. 돼지 *Semitendinosus* 근육에서 백색과 적색 근육세포 추출

- 세포 생리 및 대사가 서로 상이하다고 알려져 있는 백색근(White Muscle Satellite Cells, 이하 WST)과 적색근(Red Muscle Satellite Cells, 이하 RST)에서 추출된 근육세포의 성장 및 분화패턴을 분석하기 위해 WST와 RST가 80% confluent하게 자라면 trypsin 처리 후 cell을 계수해 RST와 WST를 각각 2:8, 1:1, 8:2비율로 섞어 배양하였음

[2년차]

○ 돼지 근육위성세포의 배양 조건 확립

- 근육위성세포 추출 및 배양조건 최적화
- 근육과 지방세포의 동시배양 기법 확립을 위해 근육위성세포의 추출 및 배양조건을 최적화하였음. 근육위성세포는 14일령 돼지 뒷다리 근육으로부터 근육위성세포를 추출하고

배양하는 방법을 최적화하였음

- 지방전구세포 추출 및 배양조건 최적화

- 지방전구세포의 추출 및 배양조건을 최적화하였음. 지방전구세포는 피하/신장 지방조직으로부터 지방전구세포를 추출하고 최적 배지조성에서의 배양방법을 최적화하였음

- 근육과 지방세포의 동시배양 조건 최적화

- 근육세포 및 지방전구세포의 배양조건을 기초로 하여 근육과 지방세포의 동시배양 조건을 최적화하였음. 동시배양을 통한 지방전구세포 및 근육위성세포의 성장, 분화 패턴 확인하였음
- 지방세포의 분화마커로서 GPDH 활성 분석법을 확립하고 동시 배양 시 지방전구세포의 분화패턴을 확인하였음

○ Microcarrier를 이용한 3D 배양기법 최적화를 통한 대량생산 기초기술 확립

- Bioreactor를 이용한 배양조건 최적화

- 문헌조사를 통해 master cell bank 확립부터 pilot scale 배양 단계까지의 과정을 설정하고 microcarrier 및 bioreactor를 이용할 경우 배지 및 시약정보를 확인하였음. 바이오리액터에서 microcarrier에 세포를 안착시켜 대량생산을 위한 pilot 배양까지의 단계는 아래와 같음(그림 9)
- 정보검색을 통해 필요한 시약과 장비를 구축하고 FDA, WHO등의 세포배양과 배양육 관련 법규를 숙지함. 본 과제의 경우 세포는 돼지근육에서 추출하여 오염여부를 확인하고 2D cell culture plate에서 증식을 한 다음 동결보관하였음. 동결보관된 master cell bank에서 세포를 해동하여 microcarrier에 안착시키고 바이오리액터에서 배양함. 근육세포의 특성을 고려하여 cytodex 1과 3을 이용하여 세포배양 후 특성을 분석하였음. Cytodex는 세포부착을 위한 표면환경이 우수하고 바이오리액터에서 배양하기 좋은 크기와 밀도를 보임. 또한 투명하기 때문에 배양후 현미경에서 세포관찰이 용이한 장점이 있음. Cytodex 1과 3의 침강(centration) 속도는 12~16cm/min, 밀도는 1.03~1.04g/cm³, dimension은 141~211 μ m임(표 2)

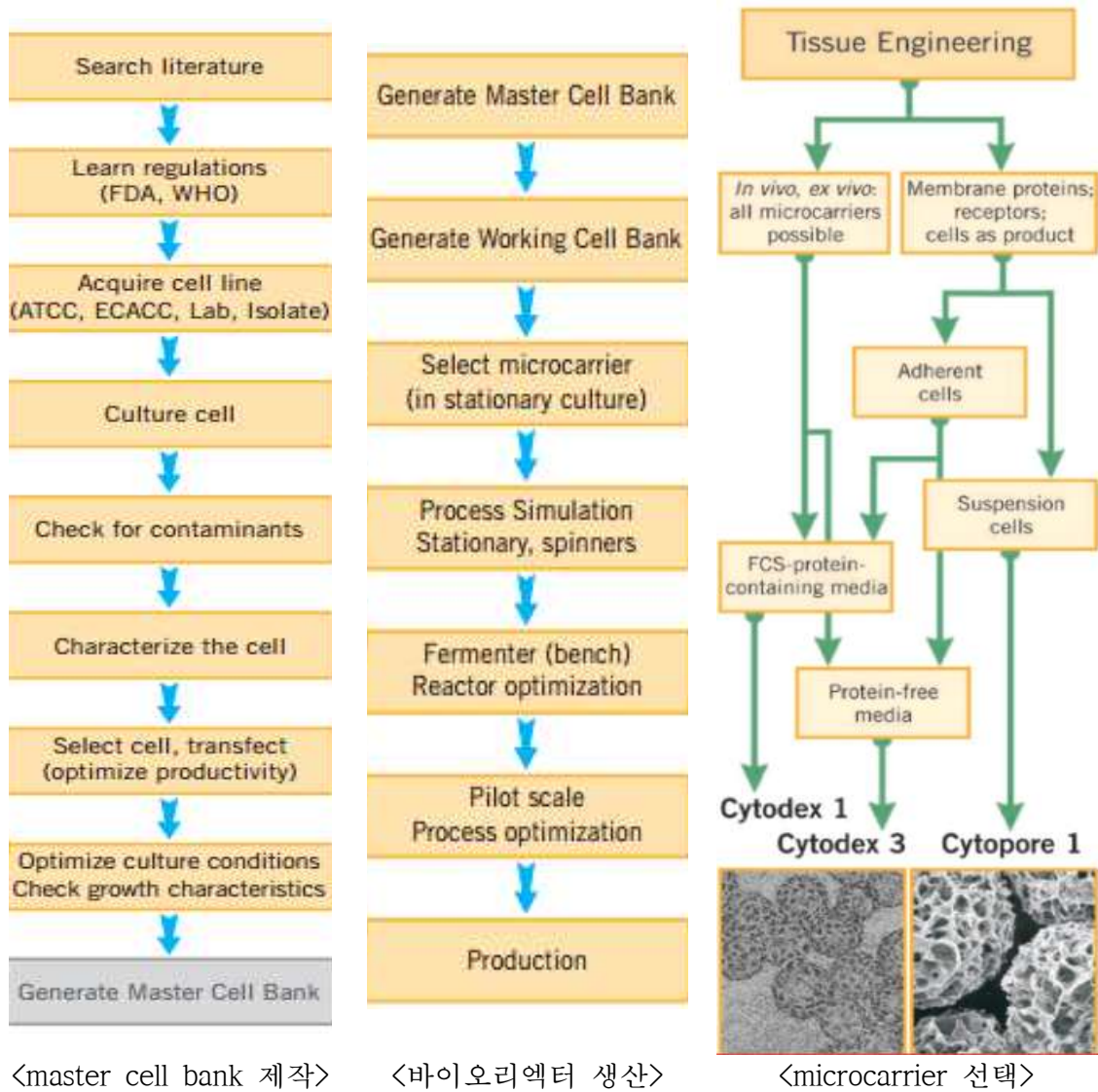


그림 9. 3D 배양을 위한 pilot 배양까지의 단계

표 2. Cytodex microcarrier 특징

구분	Sedimentation velocity	Specific density	Dimensions	Material
Cytodex 1	12~16	1.03	190	Cross-linked dextran
Cytodex 3	12~16	1.04	141~211	Collagen coated, cross-linked dextran

- Microcarrier를 이용한 3D 세포배양을 위해 spinner flask 및 Biostat B(Sartorius) bioreactor를 이용하여 최적 배양조건을 확립하였음. 특히 Biostat B bioreactor의 경우 parameter 별로 최적배양을 위한 세팅을 완료하였음

- Microcarrier 배양조건 확립 및 세포 성장패턴 분석
 - 근육세포를 이용하여 3D 배양을 위해 microcarrier로서 cytodex 1과 cytodex 3를 사용하여 세포수율을 분석하고 배양일수에 따른 세포성장, 분화 패턴을 확인하였으며, scale up 단계에서의 bioreactor 별로 세포성장 및 수율을 비교분석하였음

○ 식약처 인허가 준비

- 세미나 개최: 배양육 소개 및 연구개발 동향 소개
- 식약처 협의회 개최
 - 식약처 신소재식품과와 “세포배양육 안전관리 방안” 관련 협의 개시
 - 식품기준과와 “배양육 기준 규격” 관련 협의 개시
- 식약처 미래식품 사전안전관리 연구용역 개시
- 대체 단백질 식품 전문가 협의체 활동 개시

[3년차]

○ 돼지 근육세포 추출 및 지지체 배양 기법 확립

- 지지체 선정을 위해 식용 가능성, 세포와의 부착 가능성, 생분해성이 있는 소재를 선정함
 - 그 중 Chitosan을 선정함. 그 이유로 생분해성, 점착성, 생물적합성, 항생 작용 등의 기능이 있고, 더불어 다양한 형태로 성형이 가능하다는 점에 착안하여 세포 대량배양에 적합함을 확인(그림 10, 11)

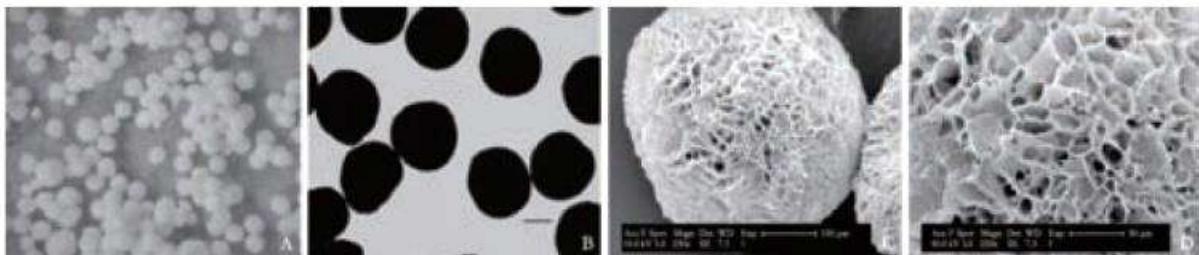


그림 10. Chitosan 기반의 microcarrier의 형태와 표면 모습

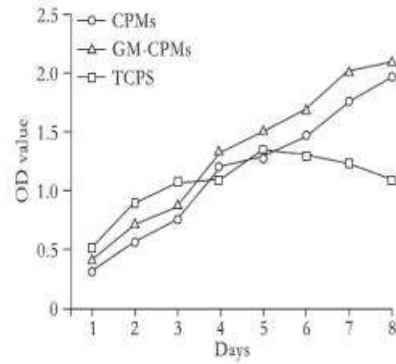
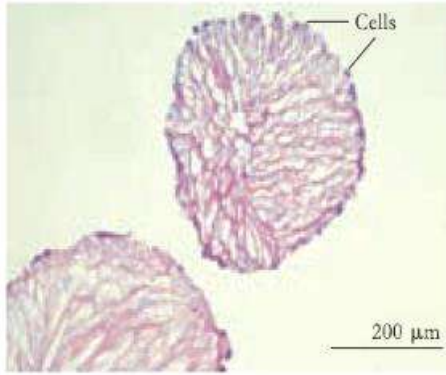


그림 11. Chitosan 기반 microcarrier

(좌) H&E 염색 결과 (우) microcarrier를 이용한 세포 배양 결과

○ 근육세포 2D 및 3D 배양 성장 비교분석

- 근육세포 성장 및 분화율 분석
 - 2주령과 6주령 근육세포의 성장분화율 비교 분석
 - hemocytometer와 trypan blue의 염색으로 1일, 3일, 5일, 7일차의 세포 수를 확인했으며, doubling time을 계산해 성장 속도를 비교함
 - 세포의 분화율은 Giemsa 염색과 MG 염색을 이용해 확인함
 - 2D와 3D 배양 시 세포의 성장률 비교는 2D 기반의 세포 비교 결과에 따라 성장률이 높은 세포를 이용해 비교함

- 근육세포 이미지 및 성장발달관련 유전자 분석(그림 12, 표 3)
 - 나이에 따른 유전자 발현양 비교를 위해 성장발달 관련 유전자를 선정하여 분석을 진행했음
 - 유전자 선정으로 세포의 성장과 분화와 관련한 PAX7, MYOD1, MYOG, MHC 1을 선정함
 - 도체의 성장과 크기와 관련된 PLAG1과 도체의 지방 합성과 연관된 FASN을 선정하여 유전자 발현량을 비교함

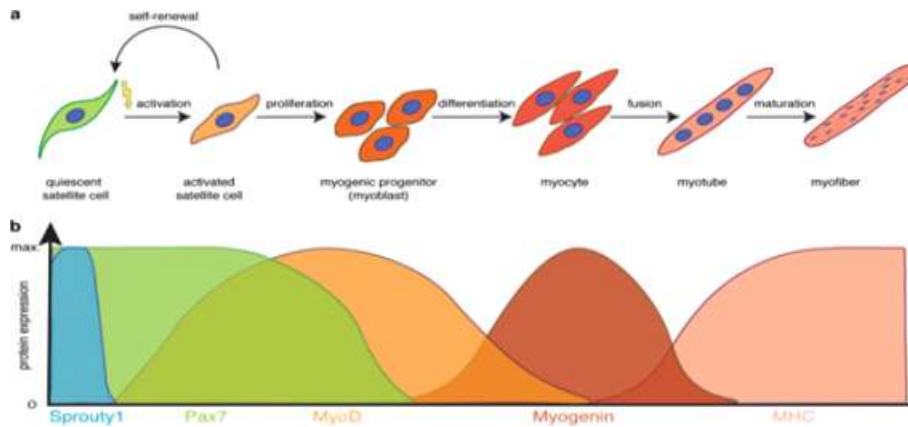


그림 12. 세포 성장 주기 중 발현되는 특정 유전자

표 3. 선정된 유전자의 특징

Gene	특징
PAX7(Paired Box 7)	MRF가 발현된 직후 발현되는 유전자로, 세포 성장과 관련됨
MYOD1(Myoblast determination protein 1)	MRF(Myogenic Regulatory Factor) family에 속한 유전자로, 세포의 성장 단계에서 주로 발현되는 유전자 중 하나
PLAG1(Pleomorphic adenoma gene 1)	도체의 성장과 크기와 관련됨
FASN(Fatty acid synthase)	도체의 지방 합성과 관련됨
MYOG(Myogenin)	성장 단계가 마무리되고 세포의 분화 단계에 진입할 때 주로 발현되는 유전자
MHC 1(Myosin heavy chain class 1)	근섬유를 형성할 때 주로 발현되는 유전자

<제1협동연구기관 서울대학교>

[1년차]

○ 돼지 배아줄기세포주 확립 및 특성화 작업

- 돼지 배아줄기세포주 확립 및 유지
 - 돼지 배아줄기세포주를 확립하기 위하여 체외에서 생산된 돼지 배반포를 이용하였음. 돼지의 난소를 수집하여 주사기를 이용하여 난포액을 채취하여 그 안에 존재하는 돼지 난자를 수거함. 수거된 난자는 TL-HEPES-PVA 용액으로 세척후 TCM배양액에서 44시간 동안 체외 성숙을 시킨 후에 체외수정 혹은 처녀생식에 사용함. 돼지 처녀생식란을 생산하기 위하여 성숙된 난자에 전기자극(1.0kV/cm, 10us)을 주고, 그 후에 PZM-3 배양액에 배양을 함. 돼지 체외수정란은 다비 인공수정 센터에서 기증받은 듀록의 정자와 체외성숙된 난자를 공배양하여 얻음. 각각의 방법으로 생산된 수정란을 168시간 동안 배양하여 부화한 배반포로 발달시킴
 - 부화한 돼지 배반포는 생쥐 태아 섬유아세포로 이루어진 영양세포와 7일간 공배양하여 돼지 배아줄기세포주를 확립하였음. 확립한 돼지 배아줄기세포주는 돼지 배아줄기세포 배양액으로 배양하며, 5-7일 간격으로 새로운 영양세포로 계대배양을 실시하였음
- 알칼라인 포스파타아제 염색 및 면역학적 염색법을 통한 만능성 검증
 - 줄기세포의 알칼라인 포스파타아제의 활성을 확인하기 위하여 알칼라인 포스파타아제 염색을 사용하였음. 계대배양후 5일간 배양한 돼지 배아줄기세포주를 4% 파라포름알데하이드 용액을 이용하여 고정함. 고정한 돼지 배아줄기세포주는 5-브로모-4-클로로-3-인돌포스페이트 툴루이딘 염 용액을 이용하여 30분간 염색을 진행함
 - 만능성 마커의 발현을 확인하기 위하여 면역학적 염색법을 이용하였음. 상기방법과 동일하게 고정시킨 돼지 배아줄기세포는 만능성 마커(OCT4, SOX2, NANOG, SSEA1, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81)에 반응하는 1차 항체를 4도에서 하루 동안 처리 후에 형광발색을 하는 2차 항체를 처리하여 형광현미경을 통해 관찰하였음
- 전사체 분석 및 후생유전학적 분석
 - 전사체 분석은 테라젠 이텍스(www.theragenetex.com)를 통해서 진행하였음. 돼지 배아줄기세포와 태아섬유아세포에서 추출한 RNA 샘플은 Agilent 2100 BioAnalyzer를 이용하여 QC를 진행한 다음 cDNA 라이브러리를 구축함. 해당 cDNA 라이브러리는 Illumina HiSeq2500를 통해 염기서열 분석을 진행함
 - OCT4와 XIST 유전자 프로모터 부분의 DNA 메틸화 양상을 분석하기 위하여 중아황산염 염기서열 분석법을 실시하였음. 돼지 태아섬유아세포와 배아줄기세포에서 gDNA를 추출하고, 이를 EZ DNA Methylation-Gold Kit를 이용하여 전처리를 진행함. 전처리된 gDNA를 템플릿으로 특정 프라이머를 이용하여 PCR을 진행하고, 해당 PCR 산물의 염기서열을 분석함

- 돼지 배아줄기세포의 분화능 검증

- 돼지 배아줄기세포의 분화능 확인을 위해 기형중 형성능과 삼배엽 유래 조직으로 유도분화능을 검증하였음. 돼지 배아줄기세포주는 STEMdiff™ Neural Induction Medium와 TEMdiff™ definitive endoderm basal medium를 이용하여 신경세포와 내배엽 세포로 분화를 유도함. 배아체 기법을 이용하여 줄기세포를 심근세포로 분화를 유도함
- 약 5-10×10⁶ 개의 돼지 배아줄기세포를 면역력이 결핍된 5주령 누드마우스의 피하에 주입함. 2-3달 후에 1-2 cm로 자란 기형성을 채취하여 4% 파라포름알데하이드를 이용하여 고정을 진행함. 고정된 조직을 이용하여 파라핀 블록을 만들어 H&E 염색을 하여 조직학적 분석을 실시함

[2년차]

○ 돼지 배아줄기세포주로부터 근육줄기세포 유도 분화

- 돼지 배아줄기세포 배양 및 분화 유도

- 부화한 돼지 배반포는 생쥐 태아 섬유아세포로 이루어진 영양세포와 7일간 공배양하여 돼지 배아줄기세포주를 확립하였음. 확립한 돼지 배아줄기세포주는 돼지 배아줄기세포 배양액으로 배양하며, 5-7일 간격으로 새로운 영양세포로 계대배양을 실시하였음
- 돼지 배아줄기세포주는 배아발달 기간 중에 근육 발달에 관여하는 것으로 알려진 신호전달 체계를 활성화 시켜줄 수 있는 다양한 신호전달물질 (LDN193189, CHIR99021, HGF, IGF, FGF2 등)을 다양한 조합으로 사용하여 분화를 유도함. 또한 소태아혈청을 대체하기 위하여 대표적인 혈청대체제인 knockout serum replacement (KSR)의 테스트를 진행하였음

- 전사체 분석

- 전사체 분석은 테라젠 이텍스(www.theragenetex.com)를 통해서 진행하였음. 돼지 배아줄기세포와 태아섬유아세포에서 추출한 RNA 샘플은 Agilent 2100 BioAnalyzer를 이용하여 QC를 진행한 다음 cDNA 라이브러리를 구축함. 해당 cDNA 라이브러리는 Illumina HiSeq2500를 통해 염기서열 분석을 진행함

- PCR 분석

- 세포 샘플로부터 Trizol 용액을 이용하여 RNA를 추출함. 추출한 RNA는 cDNA로 합성하여 qPCR 분석을 진행하였음

[3년차]

○ 돼지 섬유아세포로부터 근육줄기세포 교차분화

- Doxycycline 유도 돼지 MyoD1 발현 벡터 구축

- 3일령 LYD 교잡종 돼지의 대퇴근으로부터 분리한 위성세포에서 RNA를 추출하여 cDNA

를 합성하였음. 이를 이용하여 PCR을 통해 돼지 MyoD1유전자를 증폭하였음. 증폭된 유전자는 FUW-TetO 벡터에 삽입하였고, 이를 이용하여 doxycycline 유도 돼지 MyoD1 발현 바이러스 벡터를 생산하였음

- MyoD1 유전자 과발현 돼지 섬유아세포주 구축 및 근육 분화 유도
 - 생산된 MyoD1 발현 바이러스 벡터를 돼지 태아 섬유아세포에 3회 처리를 한 후에 근육 분화를 유도하였음. 배양 6일째까지는 doxycycline의 처리 하에 FGF2, SB431542, CHIR99021을 처리하여 분화를 유도하였고, 6일째부터는 doxycycline을 제거하였음
- PCR 분석
 - 세포 샘플로부터 Trizol 용액을 이용하여 RNA를 추출함. 추출한 RNA는 cDNA로 합성하여 qPCR 분석을 진행하였음

<제2협동연구기관 서울대학교>

[1년차]

○ 삼겹살, 목심, 등심 근섬유 조성 및 지방 분포에 의한 품질 특성 분석

- 샘플
 - 도축 2일차의 LYD 삼원 교잡종 돼지 4마리의 등심, 목심, 삼겹살을 구입하여 실험을 진행하였음
- 일반성분 분석
 - 수분, 조단백질은 AOAC(2016) 표준법에 따라 분석함. 수분은 110°C 상압가열 건조법, 조단백질은 Kjeldahl법(2200 Kjeltac Auto Distillation, Foss Tecator, Hoganas, Sweden)을 이용하였으며 조지방은 Folch법(Folch 등, 1957)으로 측정하였음
- 보수력
 - 잘게 분쇄한 등심, 목심, 삼겹살 시료를 5 g 여과지(Whatman No.4, Whatman PLC., UK)에 샘플링 한 뒤 탈지면이 들어있는 50 mL 튜브에 잘 접어 넣어준 뒤 252 × g에서 10분간 원심분리하였음(Continent 512R, Hanil Co., Ltd, Korea). 이 후 여과지에서 시료를 분리하여 무게를 잰 뒤 아래 식에 따라 보수력을 계산하였음

$$\text{보수력}(\%) = \frac{(A - B)}{A} \times 100$$

$$A = [\text{원심분리 전 무게}(\text{g}) \times \text{수분함량}(\%)]/100$$

$$B = (\text{원심분리 전 무게} - \text{원심분리 후 무게})$$

- pH

- 잘게 분쇄한 등심, 목심, 삼겹살 시료를 1 g 샘플링 한 뒤 9 mL의 증류수를 첨가한 뒤 균질기(T10 basic, Ika, Staufen, Germany)를 이용하여 균질하였음. 이후 $2,265 \times g$ 에서 10 분간 원심분리를 한 뒤(Continent 512R, Hanil Co., Ltd., Daejeon, Korea) 상층액을 여과지(Whatman No. 4, Whatman PLC., Kent, UK)를 이용하여 여과하고 pH 측정기(SevenGo2, Mettler-Toledo International Inc., Greifensee, Switzerland)를 이용하여 pH를 측정하였음

- 가열감량

- 잘게 분쇄한 등심, 목심, 삼겹살 시료를 10 g 원형 페트리 접시($35 \times 10 \text{ mm}^2$)에 샘플링 한 뒤, 진공 포장을 하고, 85°C의 항온수조에서 심부온도가 72°C에 도달할 때까지 가열하였음. 이후 시료의 온도가 상온이 될 때까지 방냉한 뒤 시료를 꺼내어 무게를 재어 아래식에 따라 계산하였음

$$\text{가열감량}(\%) = \frac{\text{가열전무게}(g) - \text{가열후무게}(g)}{\text{가열전무게}(g)} \times 100$$

- 조직감

- 상기 가열감량과 같은 방식으로 제조된 등심, 목심, 삼겹살의 패티형 시료의 물성을 조직감 측정기(AMETEK Lloyd Instruments Ltd, Fareha, UK)를 이용하여 확인하였음

- 관능평가

- 등심은 8번째 흉추에 위치한 등심근(*Longissimus m. 8th thoracic vertebrae*), 목심과 삼겹살은 예비실험 결과를 토대로 표 4와 같이 각각 목심은 3개의 근육, 삼겹살은 넓은등근(*Lattissimus dors*)과 배곧은근(*Rectus abdominis*)을 근섬유에 평행한 방향으로 $1.5 \times 1 \times 1 \text{ cm}^3$ 형태로 시료를 채취하고, 액체질소에 담가 냉각시킨 iso-pentane에 시료를 떨어뜨려 시료를 급속냉각한 후 분석 전까지 보관하였음.
- 보관한 시료를 냉동조직절편기(CM1860, Leica, Wetzlar, Germany)를 이용하여 10 μm 두께로 박편한 뒤 슬라이드 글라스에 올림. 슬라이드 위 시료에 normal serum으로 blocking한 후 primary antibody(DSHB, Iowa city, IA, USA), secondary antibody(Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA)를 순차적으로 차광상태로 incubation 시켜 형광염색을 진행하였음. 염색이 끝난 시료에 aqueous mounting medium을 1 방울 떨어뜨리고 coverslip을 덮은 뒤 관찰하였음
- 디지털 카메라(DP72, Olympus, Tokyo, Japan)가 장착된 형광현미경(BX51, Olympus)을 이용하여 형광염색된 근섬유를 관찰하고 이미지 분석 프로그램(Adobe photoshop cc 2019, Adobe, California, USA)를 활용하여 시료 조직 내의 근섬유 유형별 크기(μm^2), 면적비(%), 개수비(%)를 측정하였음










- 돈육 부위별 외관 특성에 대한 소비자 인식 조사

- 조도 220 lux 조건에서 1.5 cm 높이로 슬라이스한 등심(흉추 5번-요추 6번), 목심(경추 1번-흉추 4번), 삼겹살(흉추 5-12번)의 단면을 촬영하였음(iPhone 7 12MP dual lense

camera, f/1.8, Apple Inc.). 이후 이미지 분석 프로그램(Adobe photoshop cc 2019, Adobe, USA)을 이용하여 외관 지방을 분석하였음. 같은 시료를 색도계(CM-5, Konica Minolta Co., Ltd., Osaka, Japan)를 이용하여 육색(L^* , a^* , b^*)을 측정하였음

- 측정된 외관지방과 육색 결과를 바탕으로 등심, 목심 삼겹살 부위별 각각 3장의 샘플을 선정하였음
- 211명의 소비자들을 대상으로 사전 질문에 응답한 후 표 4의 샘플 이미지에 대하여 외관 요소인 밝기, 색도, 지방량, 지방분포를 평가하고, 각 항목에 대한 기호도와 이를 바탕으로 전체적인 종합적 기호도를 평가하도록 하였음. 각 항목은 7점 척도를 기준으로 평가되었음

표 4. 설문조사에 사용된 등심, 목심, 삼겹살 시료 정보

Cuts	Sample	Picture	L^*	a^*	b^*	ΔE	Fat content (%)
등심	A		50.4	8.6	13.9	1.24	6.2
	B		49.5	8.5	12.8	1.04	7.8
	C		51.8	8.8	14.1	2.35	13.0
목심	A		47.9	12.7	12.5	1.63	19.6
	B		50.0	10.8	13.3	3.15	23.5
	C		45.4	11.7	13.4	1.42	26.4
삼겹살	A		55.2	8.4	11.4	9.06	37.9
	B		57.14	9.16	13.26	9.26	46.9
	C		62.79	6.31	12.67	7.70	56.1

○ 품종과 성별 조건에 의한 근육위성세포 분화 특성 분석(그림 13)



그림 13. 시료 채취용 자돈 삼원교잡종(좌), 버크셔(우)

○ 연령별 자돈 근육위성세포 특성 분석

- 돼지 근육위성세포 초대배양
- 3, 25일령 자돈을 안락사 후 뒷다리를 절개하여 Biceps femoris 근육을 채취하고 4°C의 2 x antibiotics-antimycotic(AA, Gibco, Waltham, MA, USA)이 첨가된 Dulbecco's phosphate-buffered saline(DPBS, WELGENE Inc., Gyeongsan, Korea)에 분리한 근육을 보관한 뒤 페트리디쉬에 꺼내 겉면의 결체조직이나 피막, 혈액 등을 절제하여 제거한 뒤 수동 민서를 이용하여 분쇄하고 시료를 10 g씩 3개의 tube에 소분하고 각각 37°C의 pronase 용액 20mL를 40분간 처리하였음. 1200 x g에서 15분간 원심분리하여 상층액을 버린 후 20 mL DPBS를 넣고 희석한 뒤 다시 1200 x g에서 15분간 원심분리하고 상층액을 제거하였음. 이후 1 x AA가 첨가된 minimum essential medium(MEM, Gibco, Waltham, MA, USA)를 침전물이 담긴 tube에 15 mL씩 넣고 희석한 뒤 300 x g에서 5분간 원심분리하고 상층액을 모으는 과정을 2번 반복하였음. 모은 상층액을 1200 x g에서 15분간 원심분리하고 상층액을 제거하였음
- 침전물에 9 mL MEM을 넣고 희석하여 100- μ m cell strainer로 여과시켰음. 이후 여과물에 Dimethyl sulfoxide를 첨가하여 10% 동결용액 상태로 만든 뒤 cryotube에 분주하고 freezing container에 담아 -70°C에서 동결 보존하였음
- 동결 보존한 세포를 해동하여 1200 x g에서 5분간 원심분리하여 동결 보존액을 제거하고 gelatin coated 페트리디쉬에서 새로운 배양액과 함께 옮겨준 뒤 incubator에서 배양하며 세포 성장을 관찰하였으며, 배양 접시의 90% 정도의 밀도로 세포수가 증가하였을 때 계 대해 주었음

- 유전자 발현 양상 확인

- 세포 내 RNA를 TRIzol reagent(Invitrogen, Waltham, MA, USA)를 이용하여 추출하고 High-Capacity RNA-to-cDNA Kit(Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였음. cDNA는 DyNAmo HS SYBR Green qPCR Kit(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 이용하여 증폭시켰으며, 10 μ L 반응물에 primer가 1-2 pmol씩 포함되었음

PAX7

5' -GTGCCCTCAGTGAGTTCGAT-3' (forward)

5' -TCCAGACGGTTCCTTTGTC-3' (reverse)

MYOD1

5' -CTGCCCAAGGTGGAAATCCT-3' (forward)

5' -GGGGGCCGCTATAATCCATC-3' (reverse)

MYF5

5' -AGTTCGGGGACGAGTTTGAG-3' (forward)

5' -TCAAACGCCTGGTTGACCTT-3' (reverse)

MYOG

5' -GAGCTGTATGAGACATCCCCC-3' (forward)

5' -GTGGACGGGCAGGTAGTTTT-3' (reverse)

GAPDH

5' -TGCTCCTCCCCGTTTCGAC-3' (forward)

5' -ATGCGGCCAAATCCGTTTC-3' (reverse)

○ 기초 배양액 종류 및 p38 inhibitor(SB203580) 처리에 따른 근육위성세포 줄기세포능 유지 능력 향상 확인

- 돼지 근육위성세포 채취

- 14일령 LYD 자돈을 안락사 후 *Biceps femoris* 근육을 이용하여 상기 방법으로 근육위성 세포를 채취하여 실험에 이용하였음

- 기초배양액 및 p38i를 이용한 배양

- 채취한 근육줄기세포를 gelatin-coated 페트리디쉬에 MEM [10% (v/v) FBS, 1 x glutamax, 1 x AA, and 0.1 mM β -mercaptoethanol] 혹은 Skeletal Muscle Cell Growth Medium-2 BulletKit™ (SkGM-2; Lonza, Basel, Switzerland)를 이용하여 배양하며 cell culture plate 의 8-90% 수준이 되었을 때 계대를 해주었음. 동일한 방법으로 SkGM-2 배양액에 p38i(SB203580)을 처리한 실험군과 대조군을 비교하기 위하여 배양하였음

- 유전자 발현 양상 확인

- 상기한 방법으로 qPCR을 진행하였음

○ MACS를 이용한 근육위성세포의 분리 방법 정립

- 돼지 근육위성세포 초대배양
 - 14일령 버크셔, LYD, 한국재래돼지 자돈을 안락사 후 *Biceps fermoris* 근육을 이용하여 상기 방법으로 근육위성세포를 채취하여 실험에 이용하였음
- MACS를 이용한 근육위성세포 분리
 - 세포의 밀도가 8-90%에 도달할 때까지 SkGM-2(+SB203580) 배양액을 이용하여 gelatin coated cell culture plate에 배양하였으며, 이후 최적의 MACS 분리 marker를 찾기 위하여 CD90, CD29, CD56 항체(1:100, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)와 이에 해당하는 2차항체(microbeads conjugated, 1:5, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)를 반응시켜 MACS Cell separation System(Miltenyi Biotec)으로 분리하였음
- 면역화학 염색법을 이용한 MACS 효율 검증
 - MACS를 이용하여 분리한 세포와 대조군을 paraformaldehyde를 이용하여 고정한 뒤 CD29 (1:200, MAB17783, R&D Systems), CD56 (1:200; 710388, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)으로 염색하고, 핵은 Hoechst 33342(Molecular Probes, Eugene, OR, USA)를 이용하여 염색을 하였으며, 이미지를 형광 현미경(Eclipse TE2000-U, Nikon, Konan, Japan)으로 촬영하여 이미지 분석을 통하여 근육위성세포 비율을 계산하였음

○ 품종과 성별 조건에 의한 근육위성세포 분화 특성 분석

- 돼지 근육위성세포 초대배양
 - 14일령 버크셔, LYD(삼원교잡종), Korean native pig(재래돼지) 세 종의 각각 암, 수 자돈을 안락사 후 *Biceps femoris* 근육을 이용하여 상기 같은 방법으로 근육위성세포를 채취하였음
- 돼지 근육위성세포 분리 및 배양
 - 초대배양 세포의 밀도가 8-90%에 도달할 때까지 배양한 뒤 효소 처리하여 세포를 cell culture plate에서 분리하고 1200 × g에서 3분간 원심분리하여 배양된 세포를 회수하였음. 회수된 세포를 자기활성세포분리법(MACS, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)을 바탕으로 CD29 단백질 발현 특성을 활용하여 근육위성세포를 분리하였음
 - 분리한 세포를 분주하고 새로운 배양액에서 증식 배양하여 일차별로 세포 성장률을 확인하였으며, 세포의 밀도가 8-90%에 도달하는 주기에 맞추어 계대배양, 분화를 각각 진행하였음. 각 회차의 배양 혹은 분화를 마친 세포는 분석 용도에 맞춰 paraformaldehyde를 이용하여 고정 혹은 mRNA 추출하였음
- 세포 수율 및 성장률 산출
 - MACS 처리한 세포를 paraformaldehyde로 고정하고 원심분리하여 침전시킨 후 근육위성세포의 CD56과 CD29 단백질 특이적 항원항체 반응을 통해 형광염색을 진행하였음. 이후

- Hoechst33342로 세포 내 핵 염색을 진행하고 형광 현미경 이미지를 촬영하여 세포를 계수하여 근육위성세포 수율을 확인하였음
- 배양 일차에 따라 세포를 회수, 고정하고 희석한 후 일차별 세포 수를 계수하고, 배가시간을 산출하였음
- 유전자 발현 양상 및 분화율 산출
 - 상기한 방법으로 추출한 RNA로부터 cDNA를 합성하여 qPCR법을 이용하여 유전자 발현양을 확인하였음
 - 분화된 세포를 cell culture plate에 고정한 후 MHC 항체(1:200; 05-716, Sigma-Aldrich)를 이용하여 면역화학적 염색을 진행하고, Hoechst 33342로 핵을 염색하여 근섬유 발달에 의해 융합된 세포의 수를 계산하였음

[2년차]

○ 세포 유래별 분화된 근섬유의 유형 및 특성 분석

- 돼지 근육위성세포 배양
 - 상기한 방법으로 버크셔, LYD, 한국재래돼지 암수 자돈의 근육위성세포를 채취 및 분리, 배양하였으며, 매 passage마다 3일간 증식 후 2일간 분화하여 paraformaldehyde 고정 및 mRNA를 추출하여 실험에 이용하였음
- 세포면역화학법을 통한 근섬유 유형 확인
 - 상기된 방법으로 고정을 진행한 뒤 MHC 항체(DSHB, Iowa city, IA, USA), secondary antibody(Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA)를 반응시켜 형광염색을 진행하였음
- 유전자 발현 양상 확인
 - 상기 mRNA 추출 및 qPCR 방법을 동일하게 활용하여 증식과 분화 특이 marker 및 발달한 근섬유의 유형을 확인하였음. 근육위성세포 특이 primer는 상기한 것과 같으며, 추가적으로 MYH primer는 다음과 같음

MYH1

5' -TTGACTGGGCTGCCATCAAT-3' (forward)

5' -GCCTCAATGCGCTCCTTTTC-3' (reverse)

MYH2

5' -CATTGAGGCCAGGAATAGGC-3' (forward)

5' -TGCTTCCGTCTTCACTGTCAC-3' (reverse)

MYH4

5' -GACTCTGGCTTTCCTCTTTGC-3' (forward)

5' -GAGCTGACACGGTCTGGAAA-3' (reverse)

MYH7

5' -CGTGGACTACAACATCATAGGC-3' (forward)

5' -CCTTCTCAACAGGTGTGTCG-3' (reverse)

[3년차]

○ In vitro 배양육 안전성 평가

- 돼지 근육위성세포 배양
 - 상기한 방법으로 버크셔 자돈의 근육위성세포를 채취 및 분리, 배양하였으며, 10^6 cells/mL이 될 때까지 증식시킨 후 (주)젠디스에 의뢰하여 핵형 분석을 진행하였음. 총 20개의 세포에서 염색체를 계수하였으며, 염색체 분석에는 10개의 세포를 이용하였고, 핵형분석에는 2개의 세포수를 이용하였음. 분염법으로는 GTG 방법을 이용하였으며, 550 Bands의 해상도로 분석을 진행하였음
- 유전자 발현 양상 및 근섬유 유형 분석
 - 상기 mRNA 추출 및 qPCR 방법을 동일하게 활용하여 각 세포에서 분화, 발달한 근섬유의 유형을 확인하였음
 - 근섬유 유형 분석을 위하여 합성한 cDNA를 이진희석법으로 희석하였으며, 희석한 cDNA를 qPCR을 이용하여 분석하였음. Ct 값을 이용하여 농도에 따라 표준곡선을 그린 결과 R2가 0.98이상이었으며, 다음 식을 이용하여 MYH 발현량 및 비율을 분석하였음

$$\text{증폭 효율}(E) = 2^{(-2/\text{표준곡선 기울기})}$$
$$\text{MYH 상대정량} = E_{\text{MYH유형}}^{\text{Ct(MYH유형)}}$$

2-2. 연구결과

<주관연구기관 (주)진바이오텍>

[1년차]

○ 돼지 근육위성세포 및 지방전구세포의 추출기법 확립 및 추출세포 특성분석

- 조직에서의 근육위성세포 및 지방전구세포 분리 기법 확립 및 최적화
 - 근육세포수율은 근육 슬라이스의 분쇄 횟수에 영향을 받았으며. 분쇄를 2회 했을 경우 입자도가 육안으로는 크게 차이가 나지 않았지만 3회 분쇄 샘플 보다 2회 분쇄한 샘플에서 세포수율이 더 높게 나타났음. 또한, 적색근과 백색근의 경우 분쇄 후 색상차이가 뚜렷한 것이 관찰되었음(그림 14)

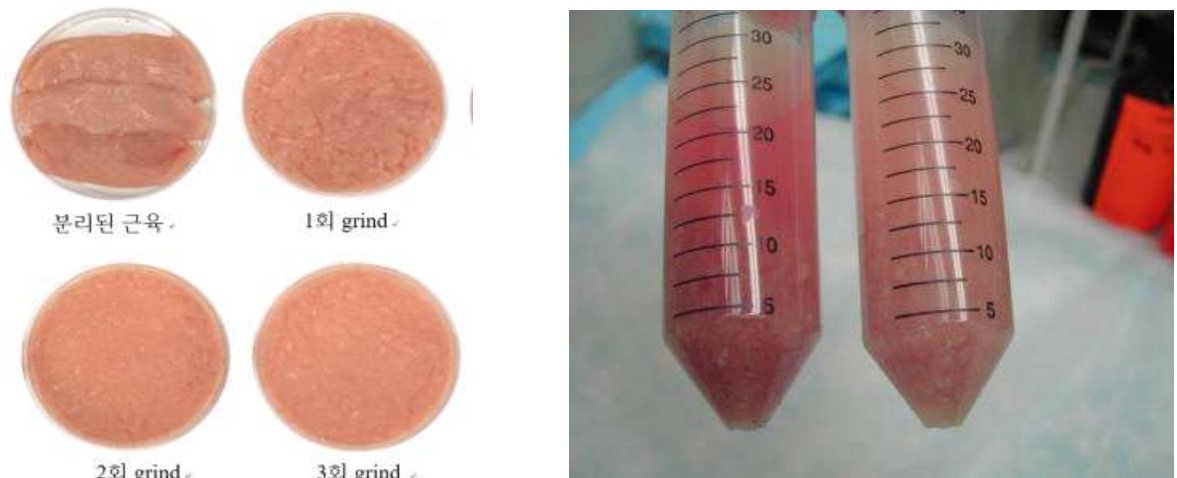


그림 14. 분쇄 횟수에 따른 morphology(좌)와 enzyme과 혼합된 적색 및 백색근육(우)

- 근육위성세포와 지방전구세포 추출 후 냉동기법 최적화
 - 비교 결과, S사의 cryostar 동결배양액으로 동결된 세포에서 다소 높은 세포수율 및 성장률을 보였지만 처리구간 유의적인 차이는 없었음. 따라서, 간단하고 저렴한 DMSO를 이용한 동결법으로 확정하였음. 또한, 4°C 에서 12시간, -20°C 에서 4시간 동결 후 -70°C 에서 보관 하는 방법과 isopropanol로 채운 container에 세포를 넣고 바로 -70°C 에서 동결시키는 방법(cell freezer)을 사용하여 동결한 결과, cell freezer container에 넣는 것이 편차를 줄이고 더 간단한 방법으로 확인되었음
- 추출된 세포의 성장발달 특성(세포수율, 성장률, 분화율) 분석
 - 세포 morphology는 그림 15에 나타내었으며 24시간 후에는 세포수율이 2×10^3 수준에서 5일 후에는 90% 이상 confluent 하게 분열하는 것을 관찰할 수 있었으며, 추출된 근육위성세포의 population doubling time(PDT)은 약 18시간으로 분석되었음

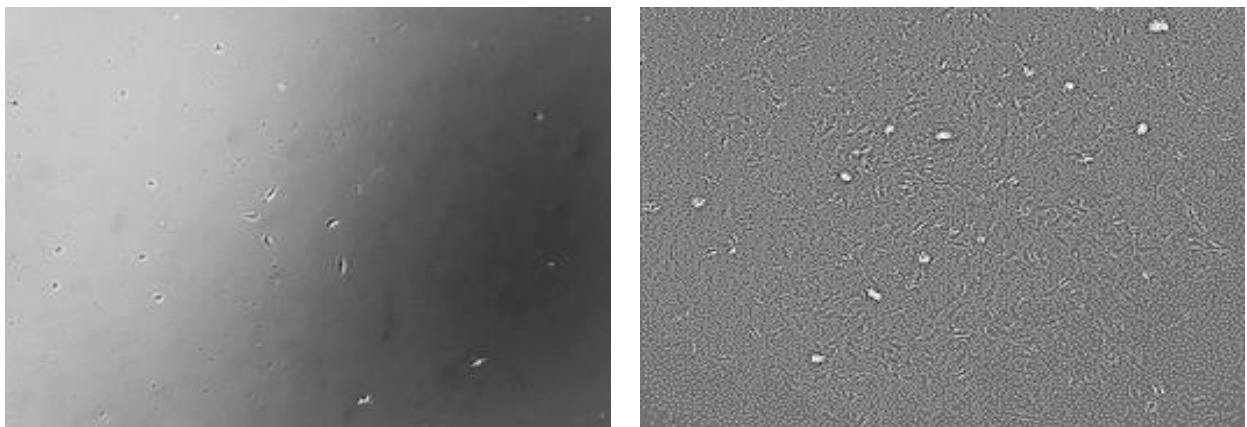
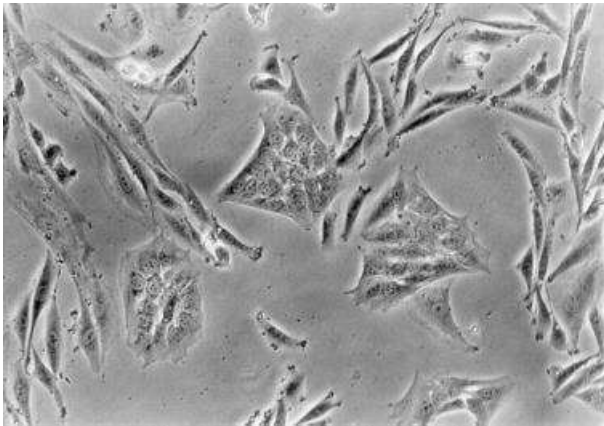
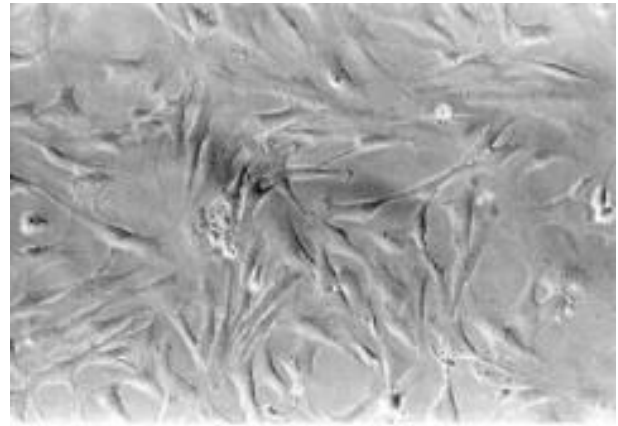


그림 15. 분주 후 24시간(좌)과 120시간(우) 후의 cell morphology

- CO₂ 배양기에서 3일간 배양된 근육과 지방세포의 성장패턴을 현미경으로 관찰하였을 때 지방전구세포는 방추사 모양으로 부착되어 세포 가운데는 세포 소기관들이 동그랗게 세포막 안에 모여 있는 것을 확인할 수 있었고(그림 16), 분화배지에서 분화가 시작되면 동그란 지방구가 형성됨을 관찰할 수 있었음. 근육세포는 지방세포보다 plate에 부착 시 더 조밀한 모습을 보이고, 지방세포와 마찬가지로 세포 안에 동그랗게 세포막 안에 소기관들이 자리 잡고 있으며, 분화가 진행되면 세포가 길게 섬유상을 형성하며 세포 내 여러 개의 핵이 융합하는 형태를 보임을 확인할 수 있었음



지방전구세포



근육줄기세포

그림 16. 3일 후의 지방전구세포와 근육위성세포의 morphology

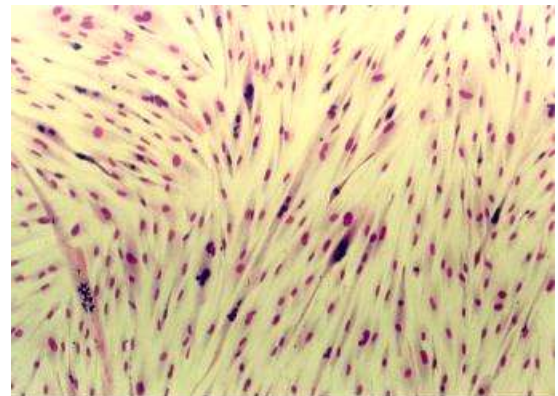
- 세포분화 및 분석조건 확립

- 분화 5일 후 여러 개의 근육위성세포 하나의 근육세포로 융합한 근섬유인 myofiber의 형성의 관찰 할 수 있었음(그림 17). 분화배지로 분화 유도된 처리구에서는 여러 개의 핵이 하나의 세포로 융합한 근섬유 (myotube and myofiber)가 형성된 것을 확인할 수 있었음

Phase contrast

Giemsa staining

근육 분화
미처리



근육 분화
처리

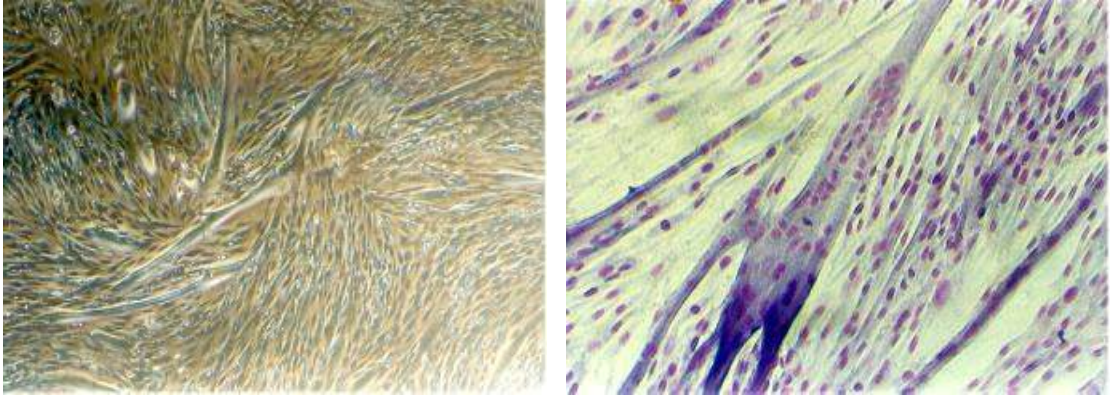


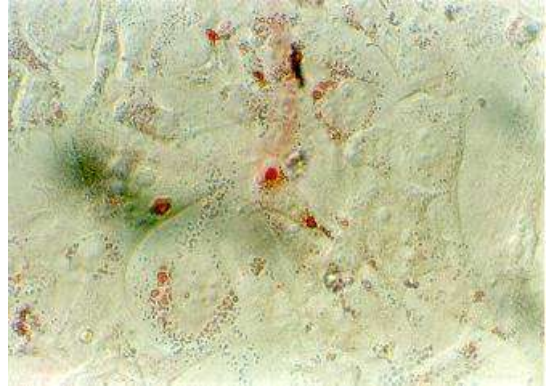
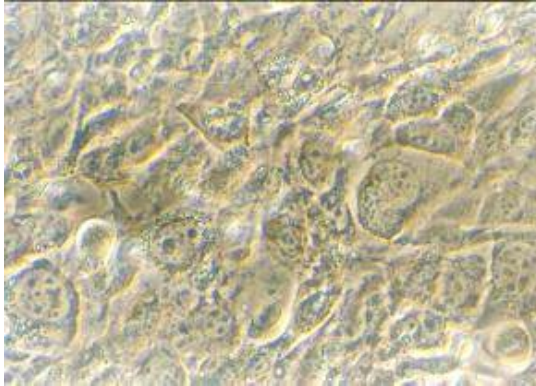
그림 17. Giemsa 염색한 근육위성세포의 morphology

- 지방전구세포에 분화배지를 처리하지 않고 GM으로 계속 배양했을 경우 그림 18과 같이 지방적 형성이 미비하나, 9일간 분화유도를 한 처리구에서는 많은 양의 지방적이 형성되어 붉게 Oil-red-O 염색이 된 것을 확인 할 수 있었음

Phase contrast

Oil-Red-O staining

지방 분화
미처리



지방 분화
처리

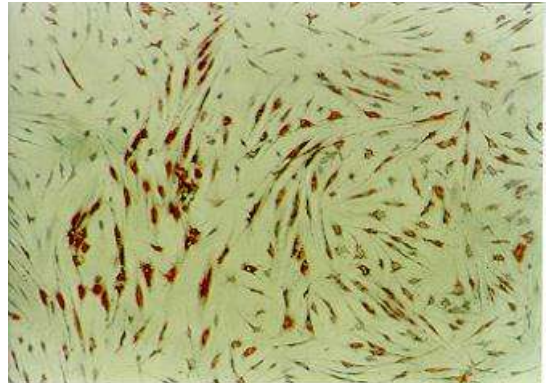
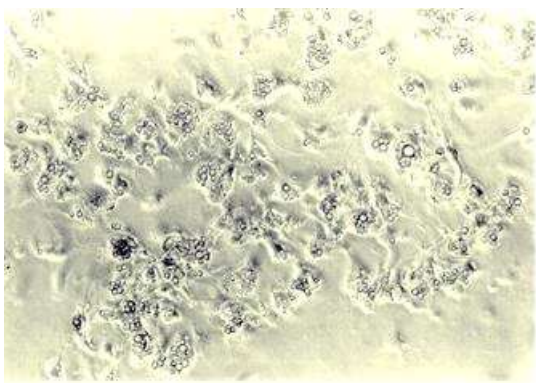


그림 18. Oil-red-O 염색한 지방세포의 morphology

○ 돼지 근육위성세포의 배양 조건 확립

- RST와 WST를 각각 2:8, 1:1, 8:2 비율로 섞어 배양 후 2일, 4일, 6일에 세포를 Giemsa 용액으로 염색하고 세포수를 분석한 결과, 배양 2일째와 4일째에는 RST와 WST를 8:2로 혼합한 그룹에서 가장 많은 세포 수를 관찰할 수 있었으며 배양 6일째에는 RST의 세포수가 가장 많았음(그림 19)

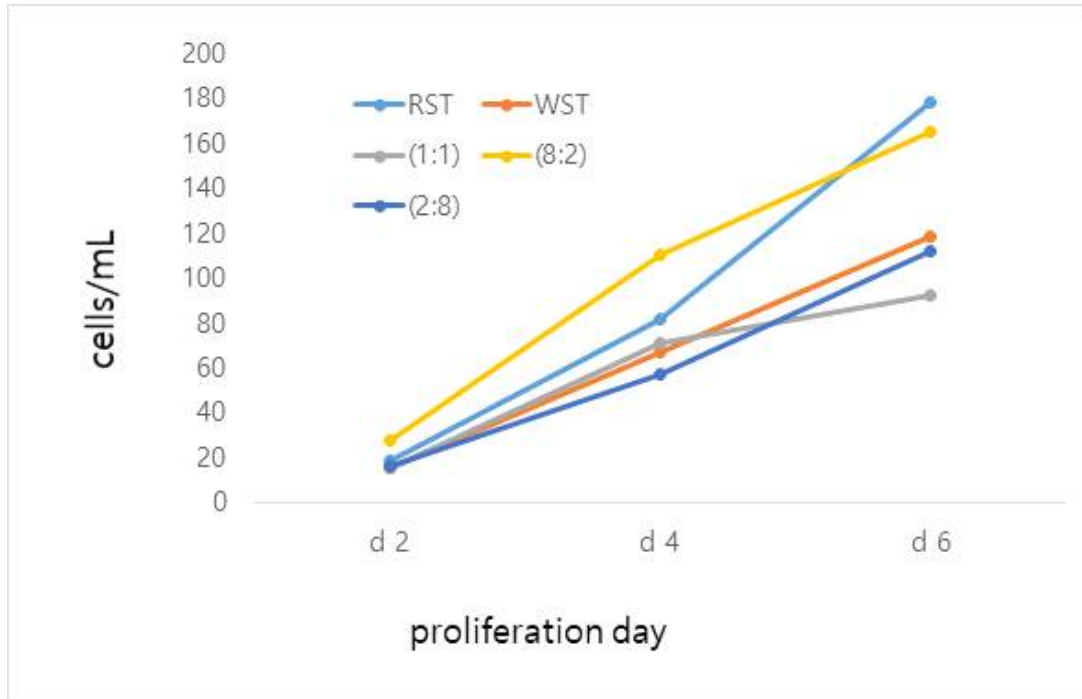


그림 19. RST와 WST 공배양에서의 세포 수

- 적색근과 백색근 유래 근육세포의 분화성상을 확인하기 위해 분화 유도 후 2일, 4일, 6일째 Giemsa 염색을 하여 분화율(분화된세포에 포함된 핵 수/ 총 핵 수)을 분석하였음. 분화 유도 2일차에 RST 그룹이 가장 높은 분화율을 보였고 분화 4일째와 6일째에는 WST 그룹이 제일 높은 분화율을 보였음

[2년차]

○ 돼지 근육위성세포의 배양 조건 확립

- 근육위성세포 배양(성장 및 분화)조건 확립 및 최적화
 - *In vitro* 배양할 시 부착성 세포(adherent cell)의 성장을 지지해주기 위해 폴리스티렌 혹은 유리로 된 cell culture plate의 표면에서 세포를 배양하는 것이 일반적이거나 이러한 2차원 표면에서 배양하는 단층(monolayer) 세포배양 방법은 세포외기질에 부착되어 3차원적으로 성장하는 생체 내 세포 환경과는 달라 2차원 culture plate의 세포와 3차원 matrix에서 자라는 세포의 형태와 성장분화 패턴은 다르며 관련 수용체, 유전자 및 단백질과 신호전달물질의 발현 및 활성 또한 실제 생체내의 세포와 매우 상이한 문제가 있음. 이러한 문제점을 해결하기 위해 세포에 공간적인 구조와 supporting material을 제공할 수 있는 gelatin, collagen 등이 사용되고 있고 최근 줄기세포 등의 연구분야에는 matrigel 또

한 많이 사용되고 있음

- 2년차부터 bioreactor를 활용한 scale-up 공정 개발에 필요한 scaffold의 기초자료를 확보하기 위해 그리고 2D에서의 근육위성세포 성장 및 분화 최적화를 위해 culture plate 표면을 다양한 matirx로 코팅한 후 세포의 분화를 유도하였음. 그 결과 RST와 WST는 matrigel로 coating된 plate에서 가장 높은 분화율을 나타내었음(그림 20). Matrigel로 coating된 plate에서 RST의 경우 42%, WST의 경우 47%의 분화율을 나타내었으며 이는 collagen과 gelatin coating 그룹과 비교하였을 때 통계적으로 유의한 차이를 나타내어($P < 0.05$) scale-up 공정 개발단계에서 활용가능성이 높은 것으로 판단되었음

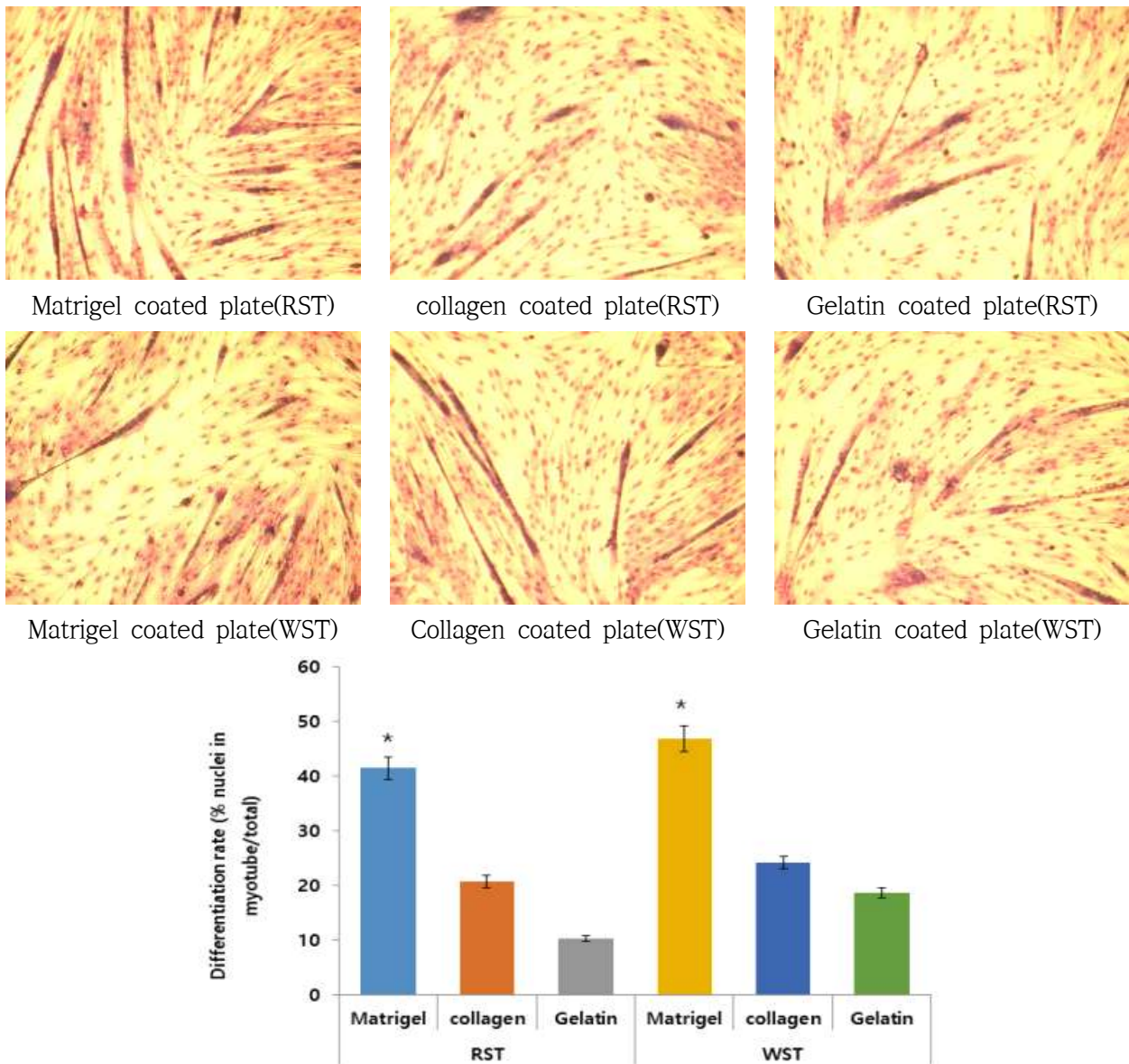


그림 20. Coating materials에 따른 근세포 성장 및 분화율

○ 식약처 인허가 준비

- 식품 인증 평가 준비 및 관련법규 개정, 보완 준비
 - 새로운 식품소재인 배양육(또는 in vitro meat)은 생산량 확보문제, 항생제 사용, GMO 등의 문제가 해결되어야 하는 국면이지만, 미래 식량안보의 확보와 물자원 절약 및 동물복지의 개념에서 연구개발에 대한 당연성과 함께 큰 관심을 받고 있음. 미국의 경우 배양육생산업체와 북미육류협회는 배양육의 상업화를 위해 관할권을 명확히 할 필요가 있음을 인지하였음. 이에 2018년 8월 23일 트럼프 대통령에게 식품의약국(FDA)과 농무부(USDA) 양 기관의 협조가 필요하다고 요청하였고, 현재 식품의약국(FDA)과 농무부(USDA)는 배양육 관할권을 확보하기 위해 서로 노력하고 있음. 하지만 일반적으로 식재료가 시장에 출하되기 전까지는 FDA 관할이고, 육류 등의 식재료 유통단계는 USDA 관할이어서 배양육의 관할권이 어디로 중심이 될지가 관건임. 배양육을 포함한 대체 축산물생산 분야에서 선도역할을 하고 있는 북미육류협회는 식품의약국(FDA)이 세포 배양기술 활용 제품을 담당하는 전문성을 이용하여 배양육의 시장 출하 전까지의 안전성 평가를 담당할 것을 제안하였고, 농무부(USDA)는 육류와 가금류 제품 검사를 수행해 온 경험과 전문지식을 활용하여 시장에 출하된 배양육의 관리와 규제를 담당하는 것이 합리적이라는 의견을 제시한바 있음. 또한 북미육류협회는 USDA와 FDA에 배양육 관련 연구자 및 생산자들이 한자리에 모여 협의회 개최 및 유기적인 관계를 유지하는 노력을 기울이고 있음. 하지만, 우리나라는 배양육 연구생산이 실제 진행되고 있지는 않지만 관심은 증가하고 있는 상황임. 본 연구팀의 배양육 생산의 기반연구가 어느 정도 진행 되면 기술적인 가능성에 대한 결과를 연구소모임, 학회, 논문 등을 통해 공유하고, 식약처와 정기적인 협의를 진행할 예정임. 미국의 사례처럼 FDA와 USDA 사이의 배양육 관할권 갈등이 재현되지 않도록 사전에 농림부와도 조율이 필요할 것으로 사료됨. 배양육이 식품으로 인정받기 위한 과정으로 배양육의 명칭에 대한 고민 또한 필요하고, 배양육의 대량·조기 생산을 위한 다양한 유전적, 생물화학적 기술에 대한 유효성과 타당성에 대한 이론 및 결과도 준비할 예정임

○ 돼지 근육위성세포의 배양 조건 확립

- 근육위성세포 추출 및 배양조건 최적화
 - 돼지의 근육위성세포의 추출과 배양방법은 아래와 같이 최적화하였음

- a. 14일령 돼지의 semitendinosus와 biceps femoris 근육을 절개하여 PBS로 washing한 후 클린벤치에서 조직을 mincing하여 50mL 튜브에 소분
- b. 효소액을 첨가하고 37°C에서 incubation
- c. 원심분리 후 pellet을 PBS에 washing 후 원심분리 (X2)
- d. MEM 용액과 잘 섞은 후 원심분리
- e. 상층액을 새로운 50mL 튜브에 모아서 원심분리 후 pellet을 배양액에 섞은 후 strainer로 침전물 여과
- f. 희석된 세포액과 동량의 DMSO와 잘 섞은 후 cryobial에 분주하고 freezing container에 넣고 -70°C에 냉동보관.
- g. 근육위성세포의 수를 hemacytometer로 counting한 후 세포를 배양용액에 섞어 cell culture- plate에서 배양하고, 2일 마다 배지를 교체함.
- h. 세포가 다 자라면 분화배지로 교체하여 분화를 유도함.

- 지방전구세포 추출 및 배양조건 최적화
 - 돼지의 지방세포 추출과 배양방법은 아래와 같이 최적화하였음

- a. 돼지의 피하/신장 지방조직을 절개하여 PBS에 washing 한 후 클린벤치에서 조직을 mincing하여 50mL 튜브에 소분 후 효소처리하여 37°C에서 incubation
- b. 배양된 용액은 필터링 후 원심분리하여 pellet을 PBS에 washing 후 원심분리하고 필터링을 통하여 지방전구세포를 수집함. 냉동보관법은 근육위성세포와 같음.
- c. 지방전구세포의 수를 hemacytometer로 counting한 후 세포를 배양액에 섞어 cell culture plate에서 배양하고, 2일 마다 배지를 교체함.
- d. 세포가 다 자라면 분화배지로 교체하여 분화를 유도함.

○ Microcarrier를 이용한 3D 배양기법 최적화를 통한 대량생산 기초기술 확립

- Bioreactor를 이용한 배양조건 최적화
 - 문헌조사를 통해 master cell bank 확립부터 pilot scale 배양 단계까지의 과정을 설정하고 microcarrier 및 bioreactor를 이용할 경우 배지 및 시약정보를 확인하였음. 바이오리액터에서 microcarrier에 세포를 안착시켜 대량생산을 위한 pilot 배양까지의 단계는 아래와 같음

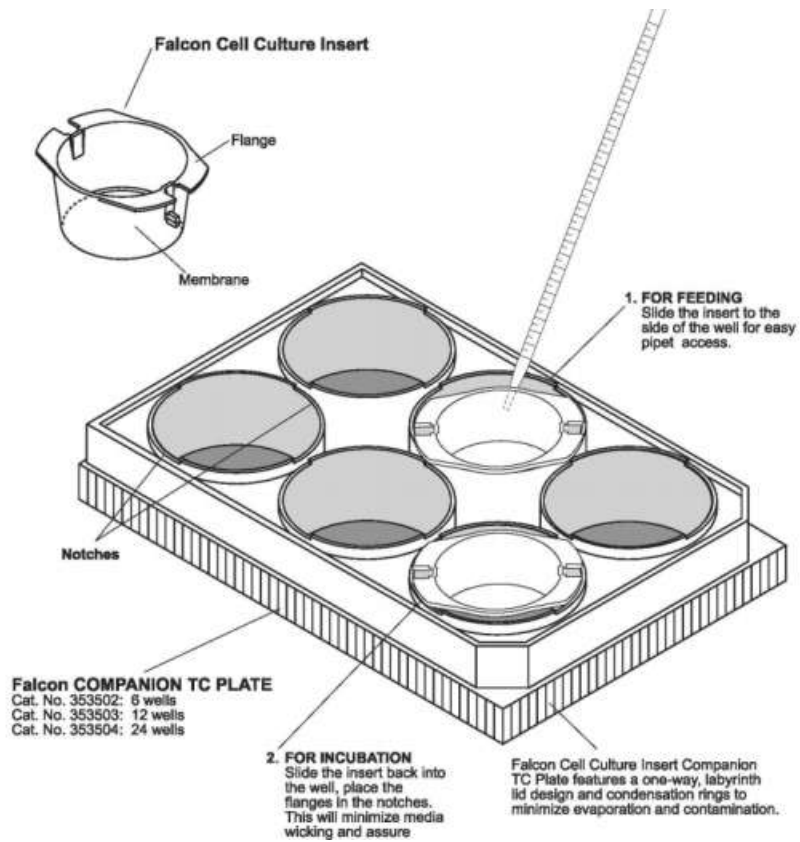
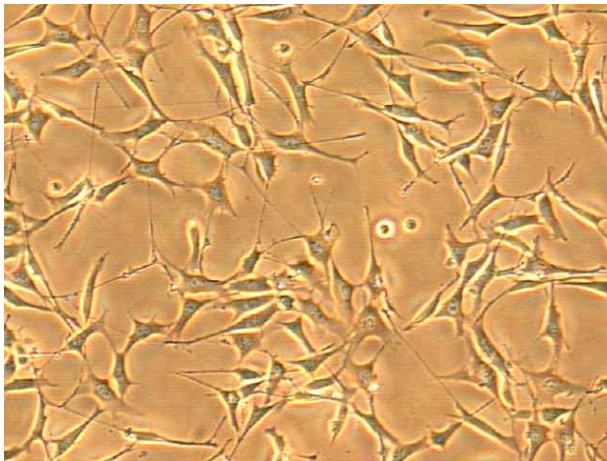
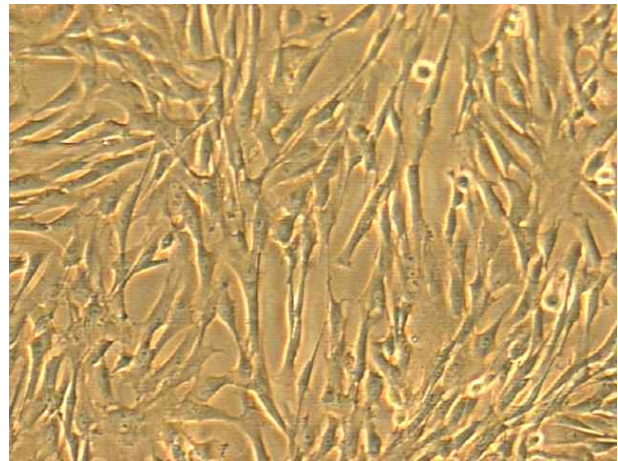


그림 21. Insert와 6 well plate 모식도



<근육위성세포 40% confluent>



<지방전구세포 80% confluent>

그림 22. 근육위성세포 및 지방전구세포 배양 사진

- 근육과 지방전구세포의 동시배양
 - 실제 *in vivo* 상에서 마블링이 형성될 때 근육과 지방이 공존하는 환경을 *in vitro*에서 구현하기 위해 지방전구세포를 6 well plate에서 배양하고, 근육위성세포는 0.4 μ m의 pore가 있는 insert에서 배양하여 두 세포 간 신호전달물질들이 공유될 수 있는 환경을 제공하였음
 - 지방전구세포는 세포를 추출하여 seeding 후 24시간이 지나면 세포가 plate 바닥에 안착

하여 세포분열을 시작하며, 약 4일 후 세포형태가 갖춰지고 분열속도가 증가하고, 일주일 이 되면 confluent하게 자라게 됨. 이때부터 분화배지를 처리하여 약 일주일 이 지나면 성숙한 지방으로 분화되는 것을 관찰할 수 있음. 성숙한 지방세포는 지방세포 내 지방적 (lipid droplet)이 생성하는 특징을 보임. 이 지방적은 Oil Red O 염색약으로 붉게 염색이 됨. 약 4일간 분화처리 시 30% 정도의 세포에서 지방적이 형성된 것을 Oil Red O 염색으로 관찰할 수 있었고, 7일후에는 약 90%의 세포가 분화 됨. 지방세포 내 triglycerides가 축적되는 데에는 acetyl-coA carboxylase와 fatty acid synthase, GPDH 등의 인자들이 관여하는데, GPDH 활성도를 측정한 결과 지방 분화도와 일치하는 것을 확인하였음

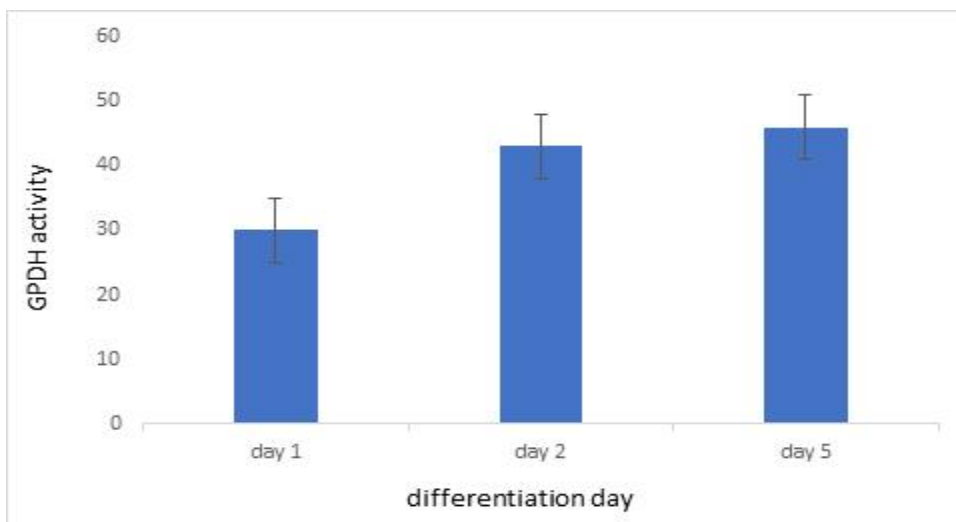


그림 23. GPDH activity 분석결과

- 근육위성세포는 seeding 다음날 6 well plate 바닥에 붙어 자라는 것이 관찰되었고, 6일간 배양 후 confluent 하게 자랐음. 이때부터 분화배지를 처리하고 약 6일 후 myotube로 분화되는 것이 관찰되었으며 9일경에는 myofiber를 형성하는 것이 관찰됨

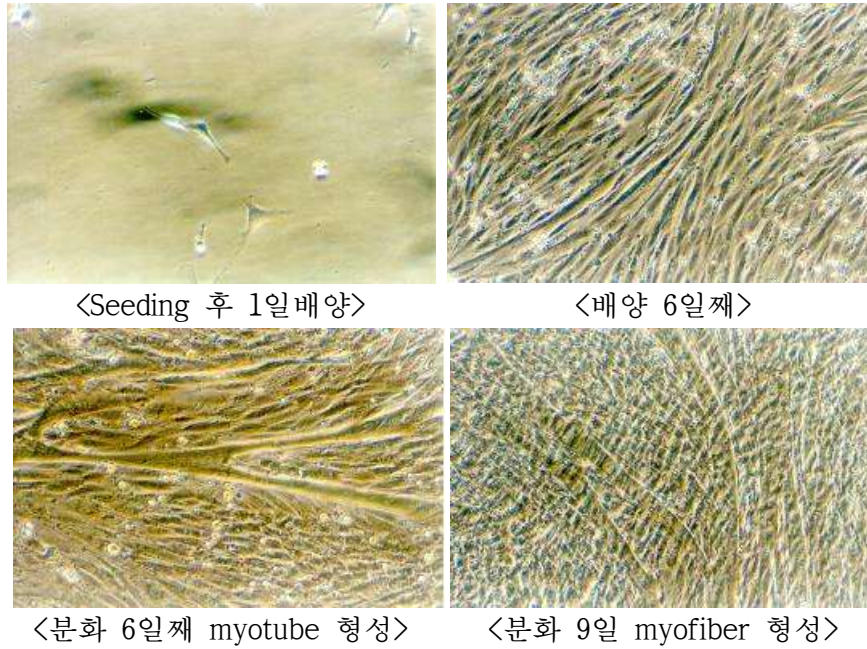


그림 24. 근육위성세포 분화

- 지방전구세포와 근육위성세포가 각각 80%와 40% confluence 상태로 자라면 근육위성세포가 배양되고 있는 insert를 지방전구세포가 자라고 있는 6 well plate로 옮겨 공동배양을 시작하고, 지방전구세포가 confluent하게 자라면 분화를 유도하고, 근육세포가 지방세포의 분화에 미치는 영향을 분석한 결과 지방세포만 배양한 경우와 공동배양 한 경우 지방적 축적이 근육과 공동 배양한 처리구에서 낮아지는 경향을 보였으나 통계적 유의적인 차이는 없는 것으로 나타남
- 지방전구세포와 근육위성세포의 공동배양 결과 지방세포의 GPDH (glycerol-3- phosphate dehydrogenase)의 활성이 감소하는 것으로 나타났음. GPDH는 지방세포의 분화 마커로 지방산과 triacylglycerol 합성에 중요한 역할을 하는 효소로 지방전구세포가 adipocyte로 분화시 증가하는 것으로 알려져 있음. GPDH 활성은 근육과 공동배양으로 인한 지방세포 분화가 저감되는 Oil Red O 세포사진 결과를 뒷받침해주는 결과임

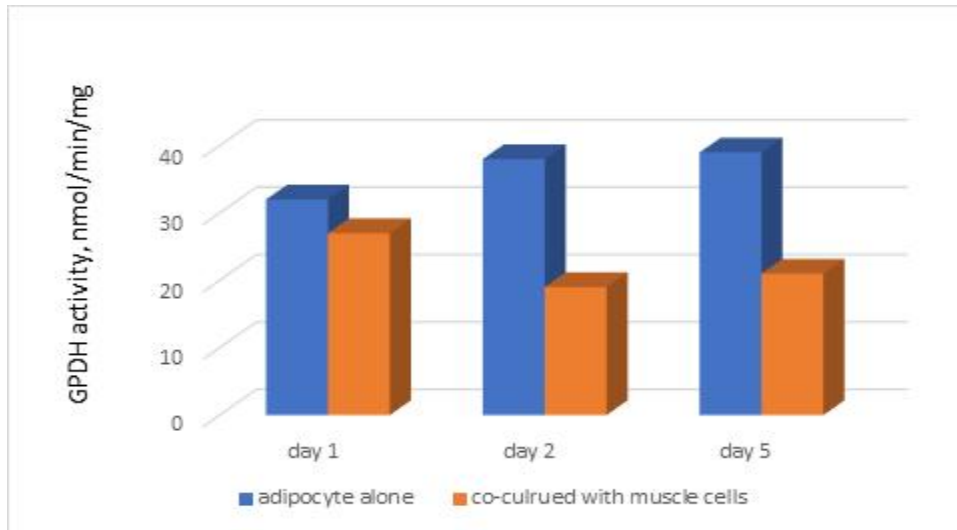
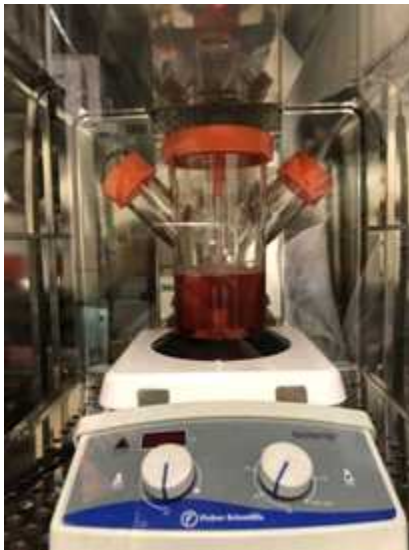


그림 25. 지방세포의 GPDH activity

○ Microcarrier를 이용한 3D 세포배양기법 최적화

- Bioreactor 배양 조건 확립 (그림 26)

- Microcarrier를 이용한 3D 세포배양 방법을 spinner flask 및 Biostat bioreactor를 이용하여 배양조건을 각각 확립



<spinner flask bioreactor>



<Biostat B>

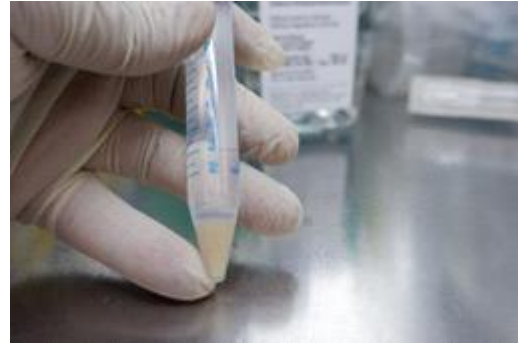
그림 26. Bioreactor 사진

- Microcarrier 배양 조건 확립 및 세포성장패턴 분석

- 근육세포를 추출하여 T75 플라스크에서 2D 배양 후 세포수율은 원심분리 전후 각각 480mL과 0.8mL로 나타났음



<원심분리된 세포 pellet>



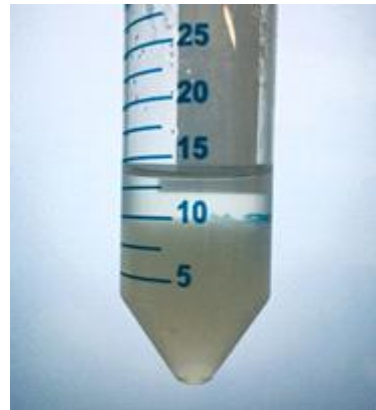
<T75 플라스크 2D 배양 세포>

그림 27. 2D 세포배양 후 세포 pellet 사진

- SFB에서 microcarrier와 함께 배양 시 cytodex 1이 cytodex 3에 비해 더 많은 세포 수를 보임(그림 28)



<근육세포 배양 with Cytodex 1>



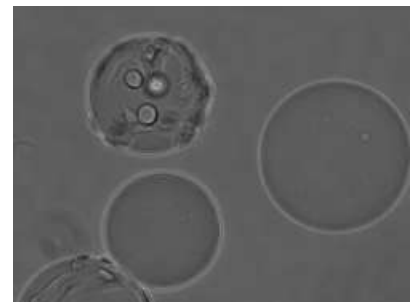
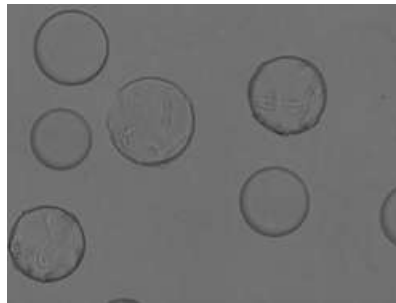
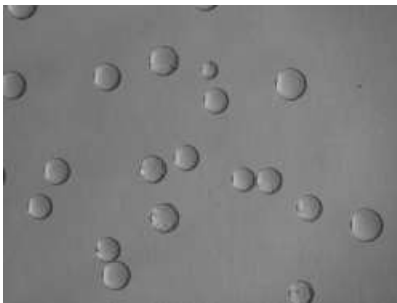
<근육세포 배양 with Cytodex 3>

그림 28. Microcarrier 이용 근육세포 배양 결과

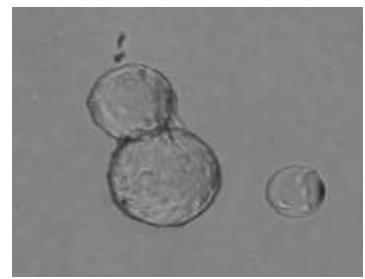
- Biostat에서 day 1, 3, 8에 세포 샘플을 관찰한 결과 day 1에는 세포가 안착되어 day 3이 되면 세포수가 증가하였고, day 8에서는 confluent한 상태로 자란 것이 관찰됨(그림 28)



<day 1>



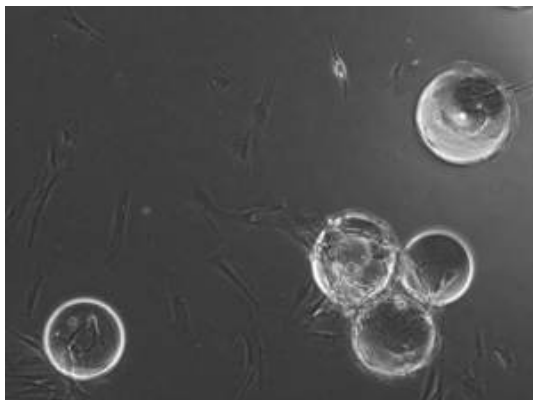
<day 3>



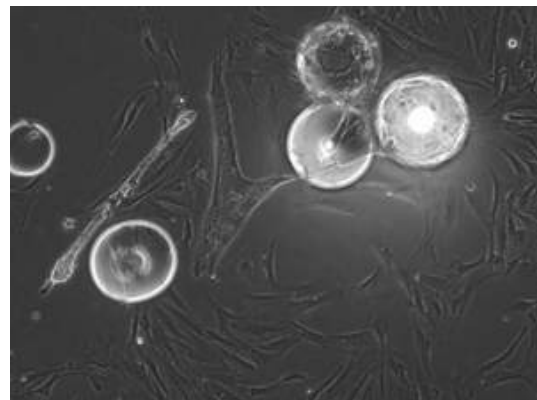
<day 8>

그림 29. Biostat bioreactor를 이용한 근육위성세포 배양 사진

- Biostat에서 세포를 샘플링하여 2D flask에서 trypsin을 이용하여 세포와 microcarrier를 분리하고 3일간 배양 한 결과 세포가 flask 바닥에서 잘 자랐고, 분화 3일 후 근육세포의 특징인 myotube가 형성되는 것이 관찰됨(그림 30)



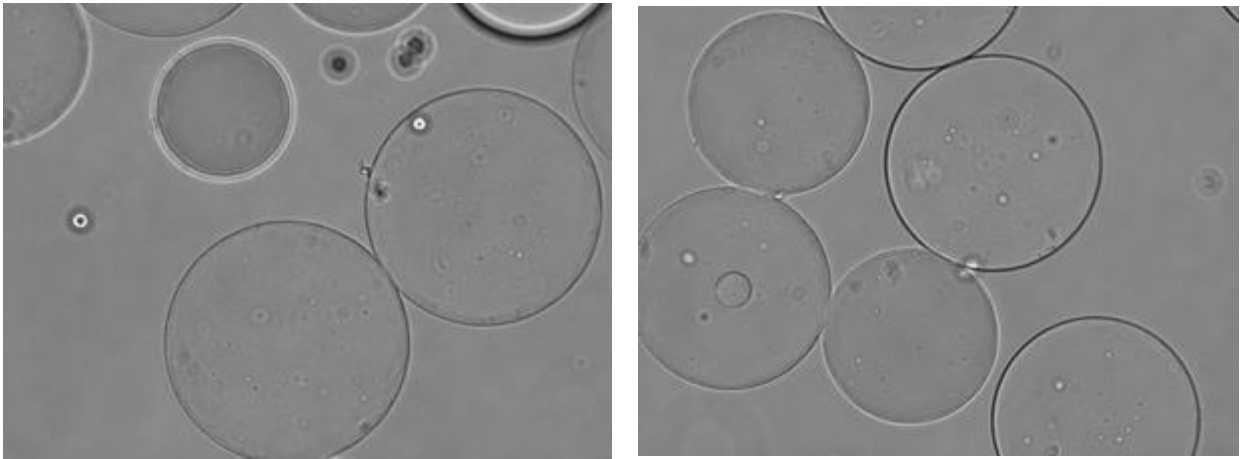
<2D flask 배양>



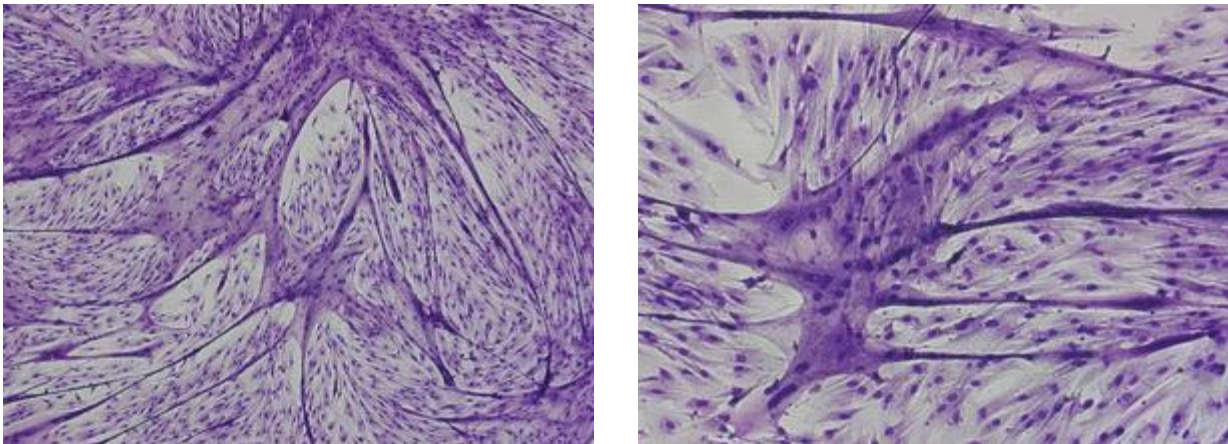
<분화된 근육세포>

그림 30. Biostat bioreactor배양 세포의 2D flask 배양 결과

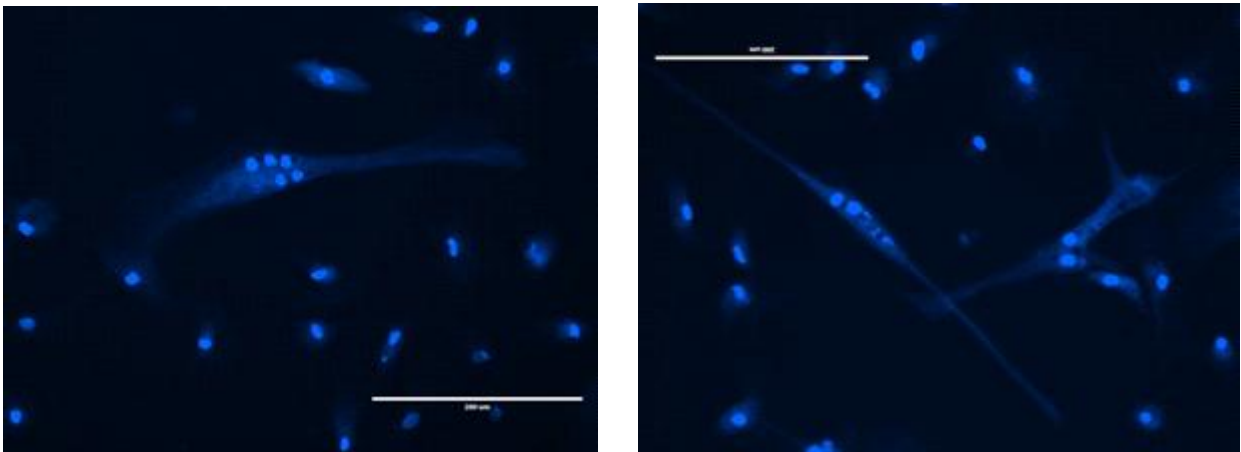
- Microcarrier에 트립신 처리를 하고 세포를 분리한 후에는 microcarrier에 남아있는 세포가 없음이 확인되었음. Microcarrier에서 분리된 세포를 배양, 분화를 유도하여 근육세포의 특징인 myotube와 myofiber가 형성되는 것을 확인하고 Giemsa와 DAPI로 염색함



<세포 분리 후 microcarrier>



<분리된 근육세포 분화; Giemsa staining>



<분리된 근육세포 분화; DAPI staining>

그림 31. Microcarrier에서 분리된 근육세포 분화 (Giemsa staining 및 DAPI staining)

- 세포수율을 비교 한 결과 SFB보다 Biostat이 세포 성장과 수율에서 효율성이 높은 것으로 나타남. 4일 배양 후 세포수를 비교했을 때 SFB는 19,000,000, Biostat은 1,900,000,000을 나타냄



<SFB 세포수>

<Biostat 세포수>

그림 32. Spinner flask bioreactor 및 Biostat bioreactor 배양 시 세포수율을 비교

○ 식약처 인허가 준비

- 식약처 인허가를 위한 준비 과정으로 식약처와 배양육 안전관리방안 및 기준규격에 대한 협의를 개시하였으며, 식품으로서 인허가 과정 중 가장 문제가 되는 안전성 문제에 대한 해결방안 확보를 위해 식약처 미래식품 사전안전관리 연구용역을 별도로 의뢰받아 세포 배양육의 상업화 대비 안전성 평가 기반연구 (2019. 6 ~ 2019. 12)를 수행 중에 있음. 또한, 향후 다양한 대체 단백질 식품에 대한 정보공유를 목적으로 식약처, 농식품부, 농진청 등 관련 정부부처와 대체 단백질 식품 전문가 협의체 활동을 개시하였음

○ 과기정통부 바이오상상프로젝트 세미나

- 일시 및 장소 : 2019.03.20. 11:00~13:00 / 과기정통부 회의실 114호
- 발표자 및 주제
 - 1) 배양육 소개 및 기술동향 - 조철훈(제2협동과제책임자)
 - 2) 배양육 상용화 현황 및 전망 - 이창규(제1협동과제책임자)

○ 식약처 초청세미나

- 일시 및 장소 : 2019.04.25. 14:00~16:00
- 발표자 및 주제
 - 1) 국내외 배양육 연구개발 동향 - 조철훈(제2협동과제책임자)
 - 2) 세포배양육 제조기술 - 이창규(제1협동과제책임자)

○ 식약처 신소재식품과와 “세포배양육 안전관리 방안” 협의

- 일시 및 장소 : 2019.04.25. 16:00~17:00
- 협의 : 이창규, 조철훈



- 식약처 식품기준과와 “배양육 기준규격” 관련 협의 개시
 - 일시 및 장소 : 2019.07.22. 15:00~17:00
 - 주제 : 배양세포 등 새로운 식품원료 안전관리 절차(안)
 - 협의 : 이창규, 조철훈

- 식약처 미래식품 사전안전관리 연구용역 개시
 - 연구책임자 및 연구원 : 조철훈(연구책임자, 서울대), 이창규(서울대), 박성권(세종대)
 - 연구과제명 : 세포배양육의 상업화 대비 안전성 평가 기반연구
 - 연구과제기간 : 2019.07.16.~ 2019.12.15.
 - 연구내용
 - 1) 국내 및 제외국의 세포배양육 연구개발 및 규제동향 등 조사
 - 2) 세포배양 기술 등을 이용하여 제조된 배양육의 안전성 평가 방법 등 조사
 - 3) 배양육의 안전성 평가 방안 마련

- 신소재 식품 안전관리 방안 세미나 개최
 - 일시 및 장소 : 2019.09.30.
 - 주제 및 발표자 : 신소재 식품의 안전관리제도 (식약처 신소재식품과 장미란 연구관)

- 대체 단백질 식품 전문가 협의체 활동 예정(이창규, 조철훈, 박성권)
 - 목적 : 대체 단백질 식품 현황 정보공유 및 협의체 운영
 - 일시 및 장소 : 2019.10.29. 서울중앙우체국 국제회의실
 - 참석자 : 식약처, 농식품부, 농진청 등 23개 기관 35명
 - 논의사항
 - 1) 대체 단백질 식품 전문가 협의체 운영방안
 - 2) 국내외 대체 단백질 식품 관리 현황 및 방안
 - 새로운 식품원료 안전관리 절차
 - 3) 국내외 대체 단백질 식품 연구개발 및 산업화 현황 정보공유
 - 식물성고기/계란, 식용곤충식품, 세포배양단백식품 등
 - 4) 대체단백질 식품 소개

[3년차]

○ 돼지 근육세포 추출 및 지지체 배양 기법 확립

- 지지체 선별 및 배양조건 최적화
 - Chitosan 기반 microcarrier 제작을 위해 필요한 Acetic acid와 섞었을 때의 pH 변화를 Chitosan 농도에 따라 확인함

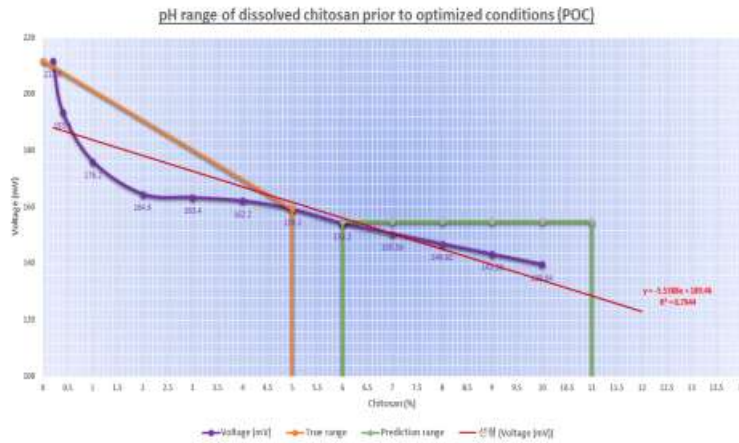


그림 33. Chitosan 농도에 따른 최적화 전 pH 결과

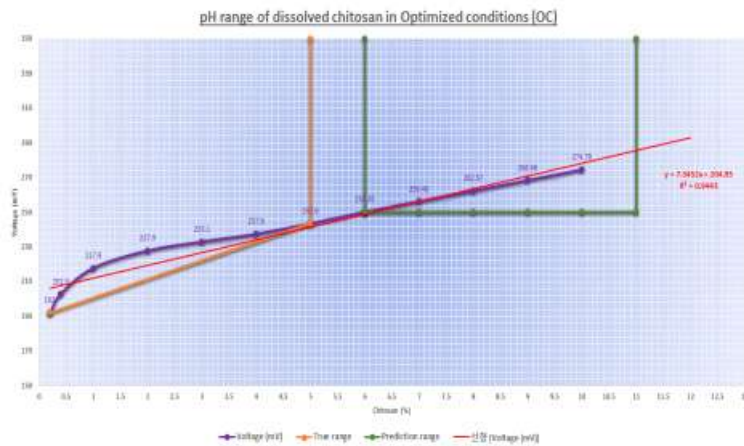


그림 34. Chitosan 농도에 따른 최적화 후 pH 결과

- 그 결과, 세포 배양 시 적합한 pH인 7.2~7.4를 고려했을 때, Chitosan을 이용하여 microcarrier를 제작하는 것이 적합함을 확인

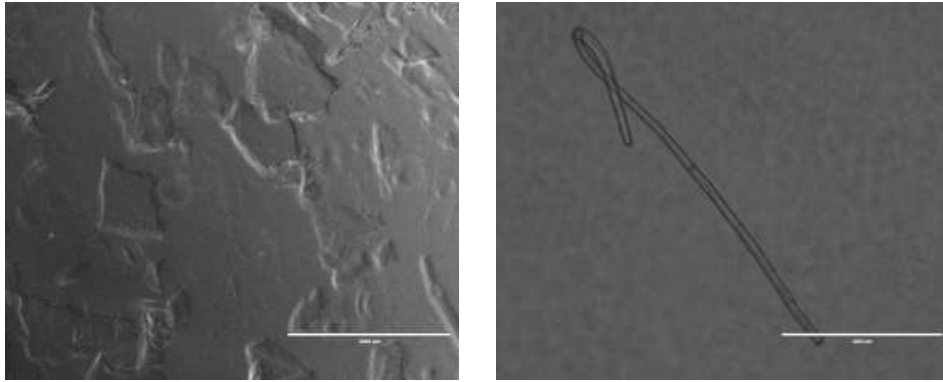


그림 35. NaOH 농도에 따른 지지체 결과
(좌) 1M NaOH, (우) 5M NaOH

- 5M의 NaOH에 있을 때의 지지체가 일정한 형태를 유지하는 것을 확인함

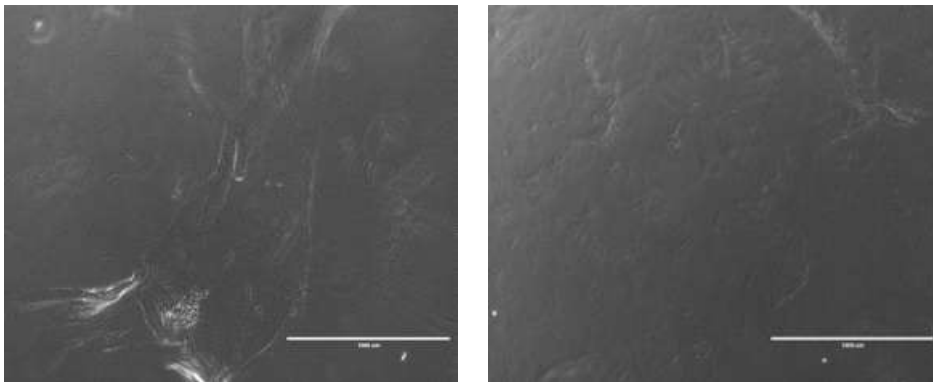


그림 36. Acetic acid를 첨가하지 않았을 때의 Chitosan 지지체의 모습

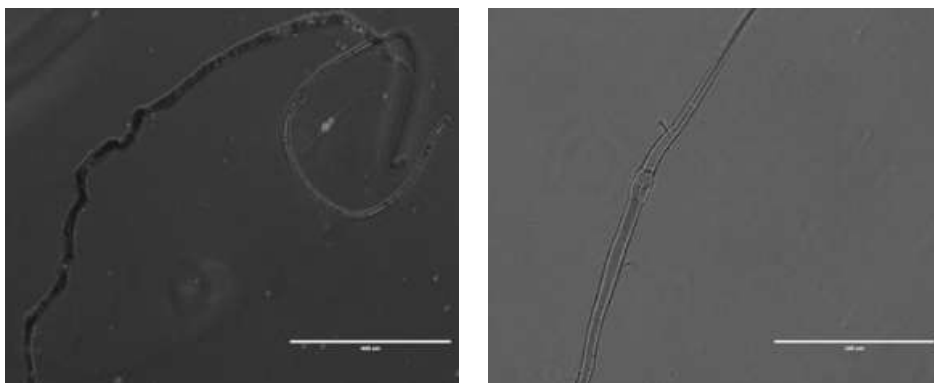


그림 37. Acetic acid를 첨가 후 Chitosan 지지체의 모습

- 또한 Acetic acid를 첨가했을 때, 지지체의 형태를 유지하는 것을 확인할 수 있었음

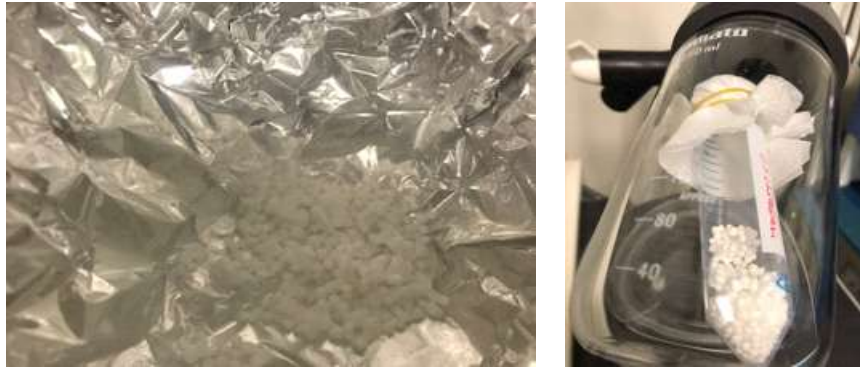


그림 38. chitosan을 이용한 Microcarrier 제작 결과

- Chitosan based microcarrier를 제작한 뒤 증류수에 넣어 그의 형태를 관찰함. 그 결과 대량배양에 사용했던 기존의 microcarrier인 Cytodex 1과 3와 비슷한 구 형태를 이루고, 형태를 유지하는 것을 확인함

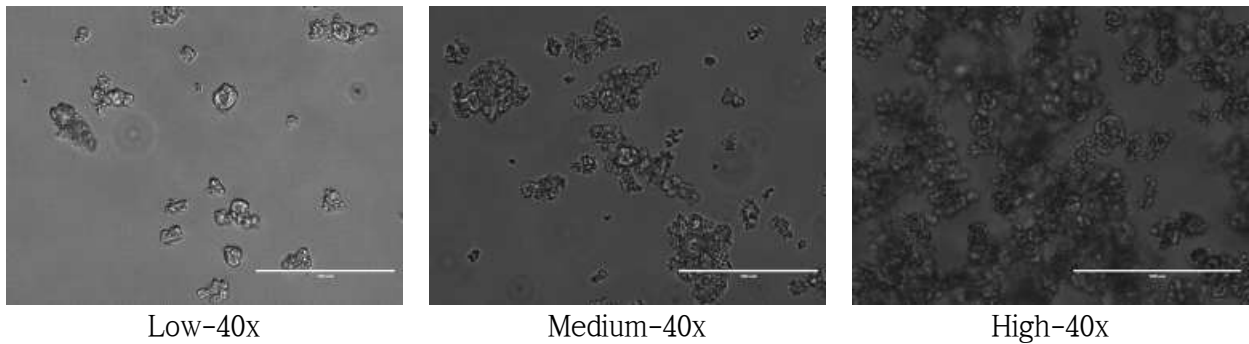


그림 39. Chitoasn 기반의 microcarrier를 농도를 다르게 하여 증류수에 넣었을 때의 모습

<Microcarrier의 결정화>

- 제작한 Microcarrier의 보다 안정된 형태를 유지하기 위해 결정화를 진행함.
- SEM 현미경을 통해 그 형태를 관찰함.

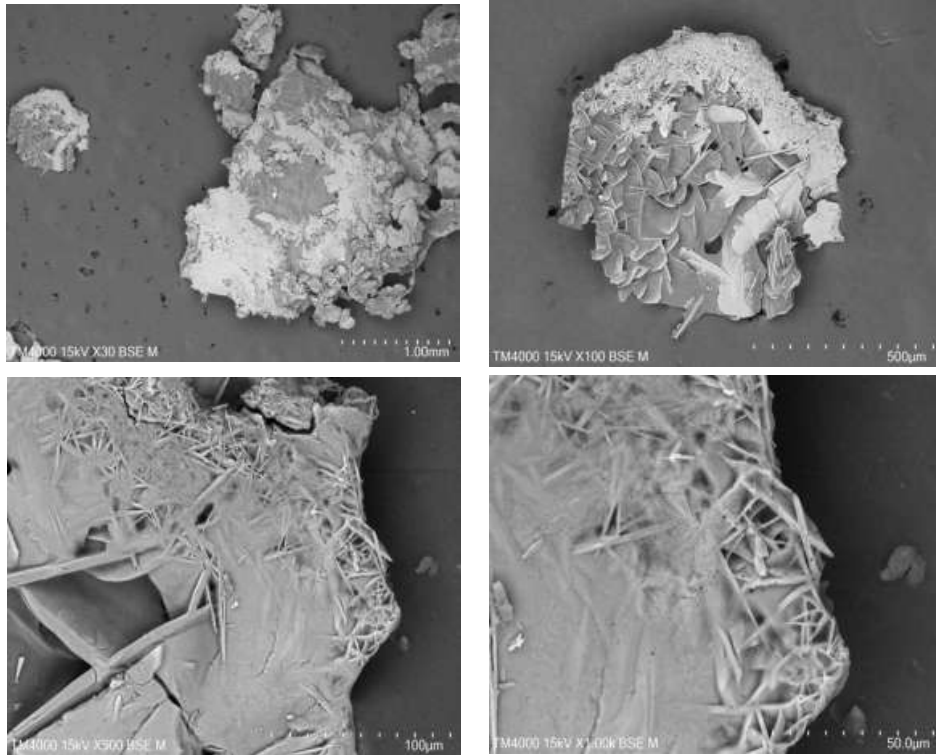


그림 40. SEM 현미경으로 관찰한 Glutaraldehyde Saturated Toluene (GST)와 3% Chitosan과 1:1 혼합한 뒤 결정화 결과

- Glutaraldehyde Saturated Toluene (GST)와 키토산을 혼합한 뒤 결정화 결과, 거친 표면을 생성되는 것을 볼 수 있었음. 이를 통해 배양육 시제품 제작 시, 식감에 영향을 줄 수 있을 것을 확인함

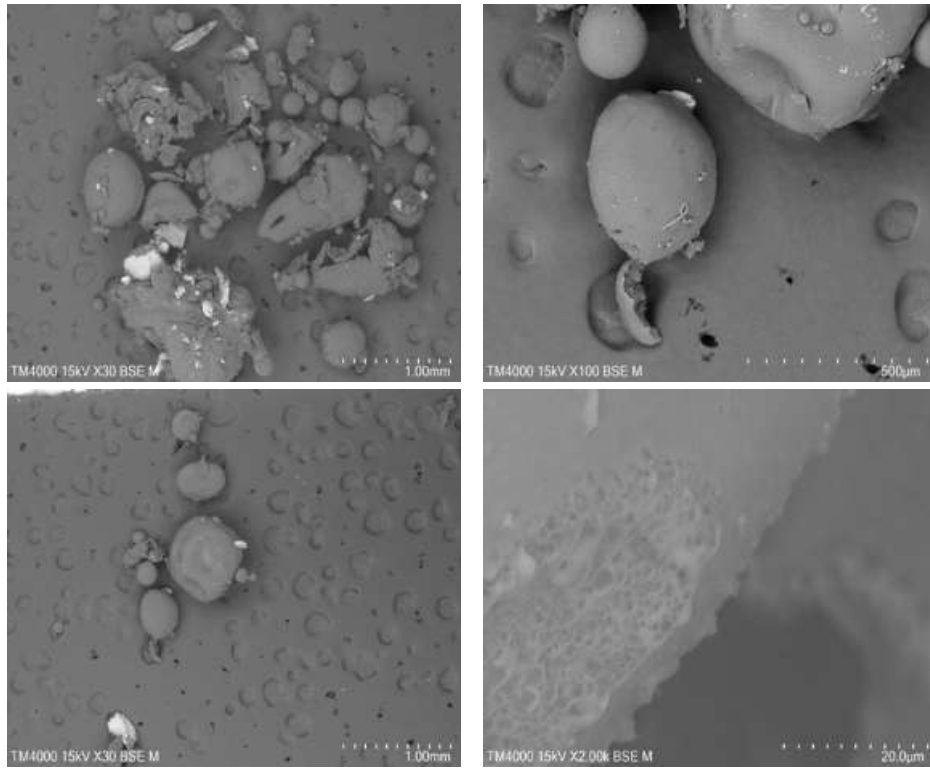


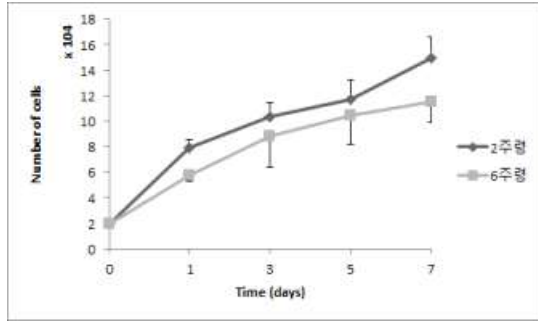
그림 41. SEM 현미경으로 관찰한 1M NaOH와 3% Chitosan과 혼합한 뒤 결정화 결과

- NaOH와 키토산을 혼합한 뒤 결정화 결과, 부드럽고 거친 표면이 생성되는 것을 볼 수 있었고, 이로 인해 넓은 표면적이 생성됐기 때문에 세포 부착에 적합할 수 있음을 확인

○ 근육세포 2D와 3D 배양 성장 비교 분석

- 근육세포 성장 및 분화율 분석

- 각 세포는 12well plate에 분주했으며, 7일간의 세포 성장 상태를 확인하고, 이를 바탕으로 doubling time을 계산함



Sample	Doubling Time (day)
2주령	2.43
6주령	2.79

그림 42. 2주령과 6주령 근육에서 추출된 세포의 성장 곡선과 doubling time 계산 결과 (p<0.05)

- 근육 세포의 성장 비교 결과, 비교적 2주령 근육에서 추출된 세포가 유의적으로 빠른 성장을 보였음
- 세포의 분화율 비교를 위해 세포를 분주 한 후, 세포의 confluency 가 80-90%가 되었을 때, 분화배지를 이용하여 세포의 분화를 유도함
- 24hrs, 48hrs, 72hrs, 96hrs 마다 분화상태를 확인하고 Giemsa 염색과 MG 염색을 이용하여 관찰함
- 분화율 계산은 $\frac{\text{Myotube 내 세포수}}{\text{총 세포수}} \times 100(\%)$ 로 계산함

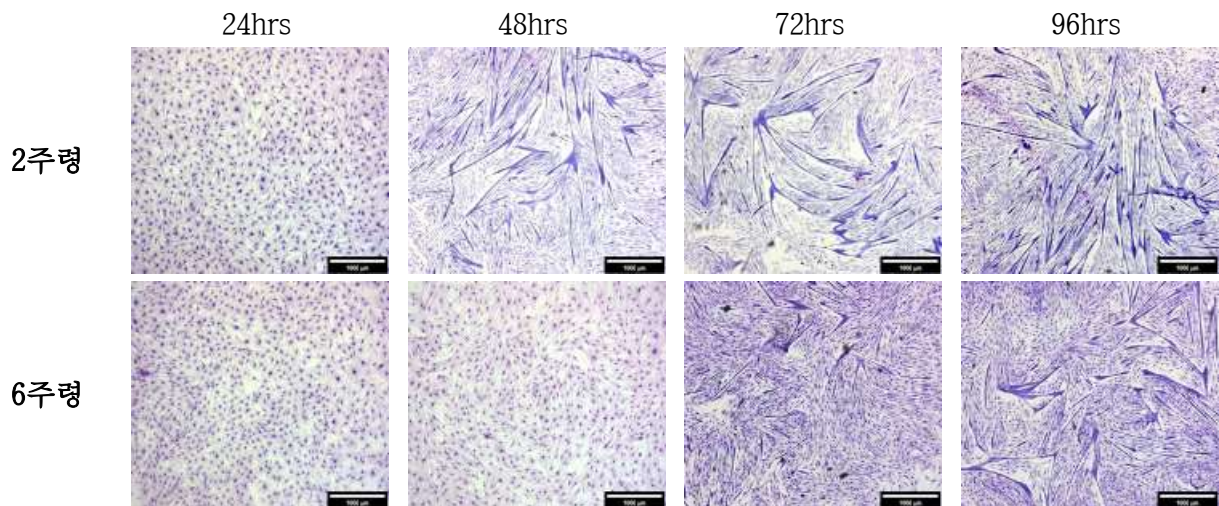


그림 43. 근육세포의 분화 morphology

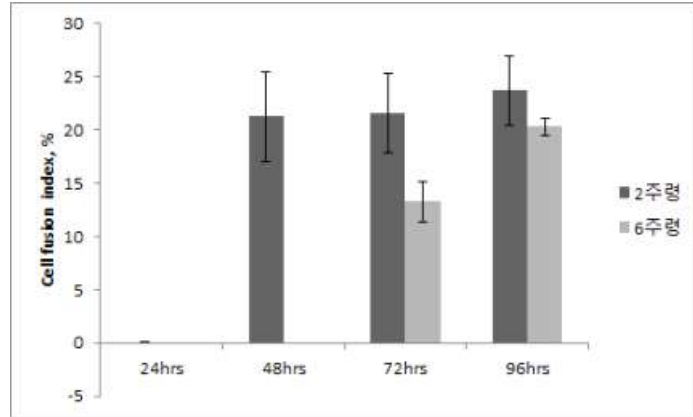



그림 44. 근육세포의 분화율 결과

- 근육세포의 분화 비교 결과, 2주령에서 추출된 세포의 경우 48hrs 이후에 myotube가 생기는 것을 확인할 수 있었고, 6주령에서 추출된 세포는 72hrs가 돼서야 확인될 수 있었음
- 3D 배양의 경우, 2주령에서 추출된 세포를 이용해 배양을 진행했으며, 아래의 순서로 배양을 진행했음(그림 45)

Steps	Procedures
<p>2D 기반으로 세포 배양을 진행함. (T25, T75, T175 plates).</p>	
<p>2D 배양 진행한 세포를 Trypsinization을 진행</p>	


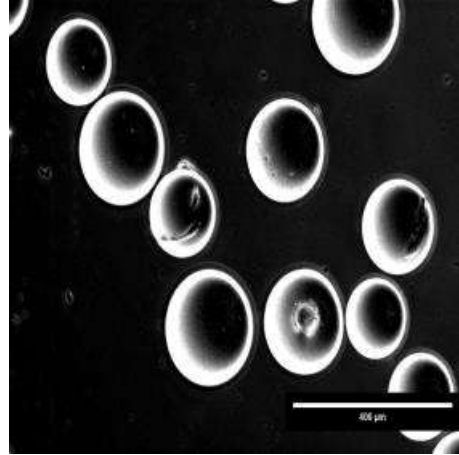
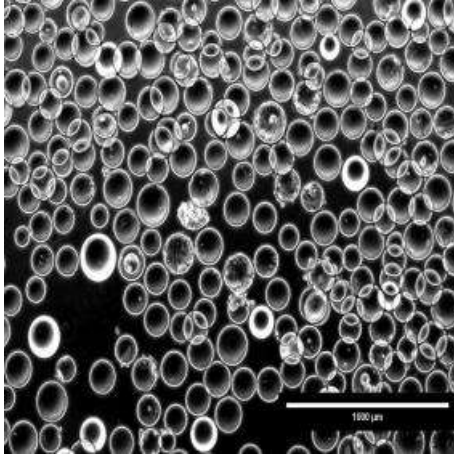
<p>Autoclave 된 microcarrier (Cytodex 3)를 넣음.</p>	
<p>Reactor Growth media와 Trypsinization한 세포를 함께 Spinner Flask Batch (SFB)에 분주함</p>	
<p>37°C, 5% of CO₂ 환경에서 인큐베이터에서 배양 진행함.</p>	

그림 45. 3D 배양 진행 순서

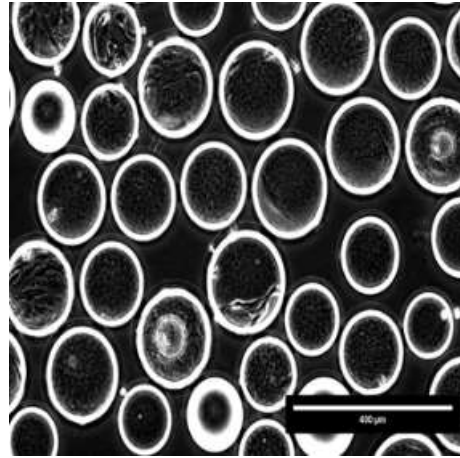
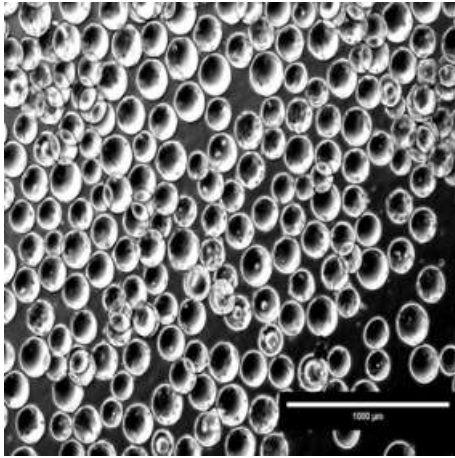
4x

10x

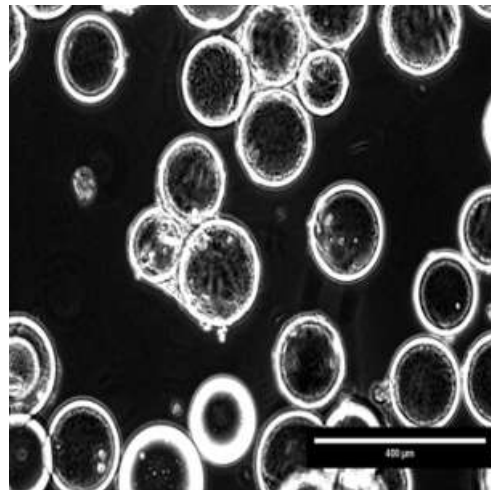
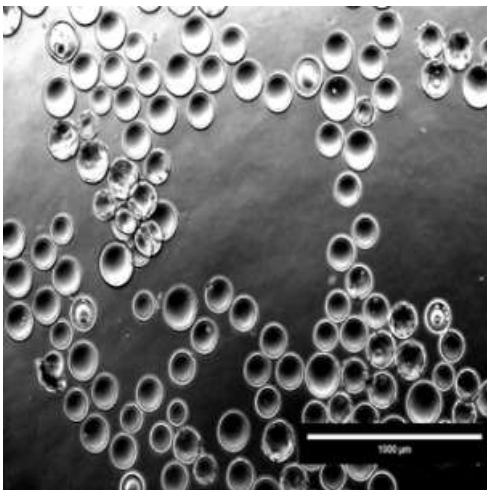
Day 1



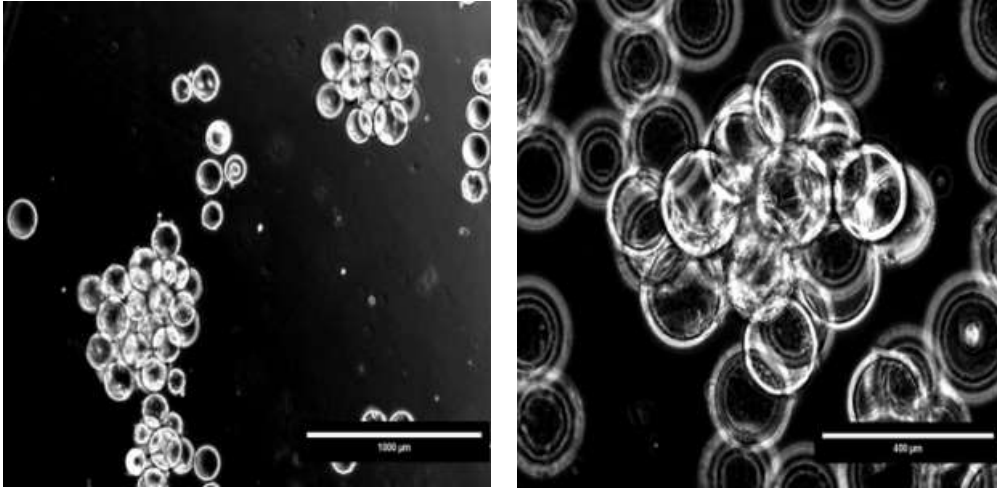
Day 3



Day 6



Day 9



Day 12

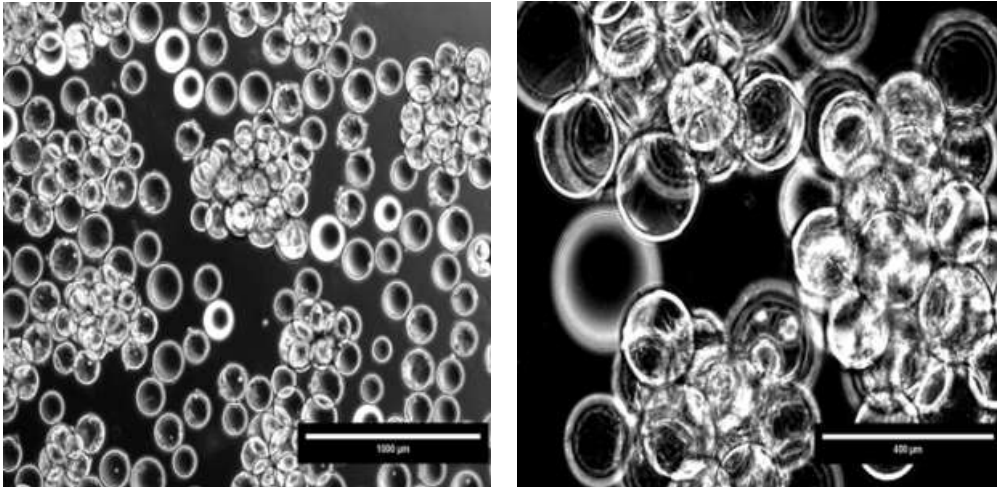


그림 46. 3D 배양 시 관찰된 microcarrier와 세포 부착 결과

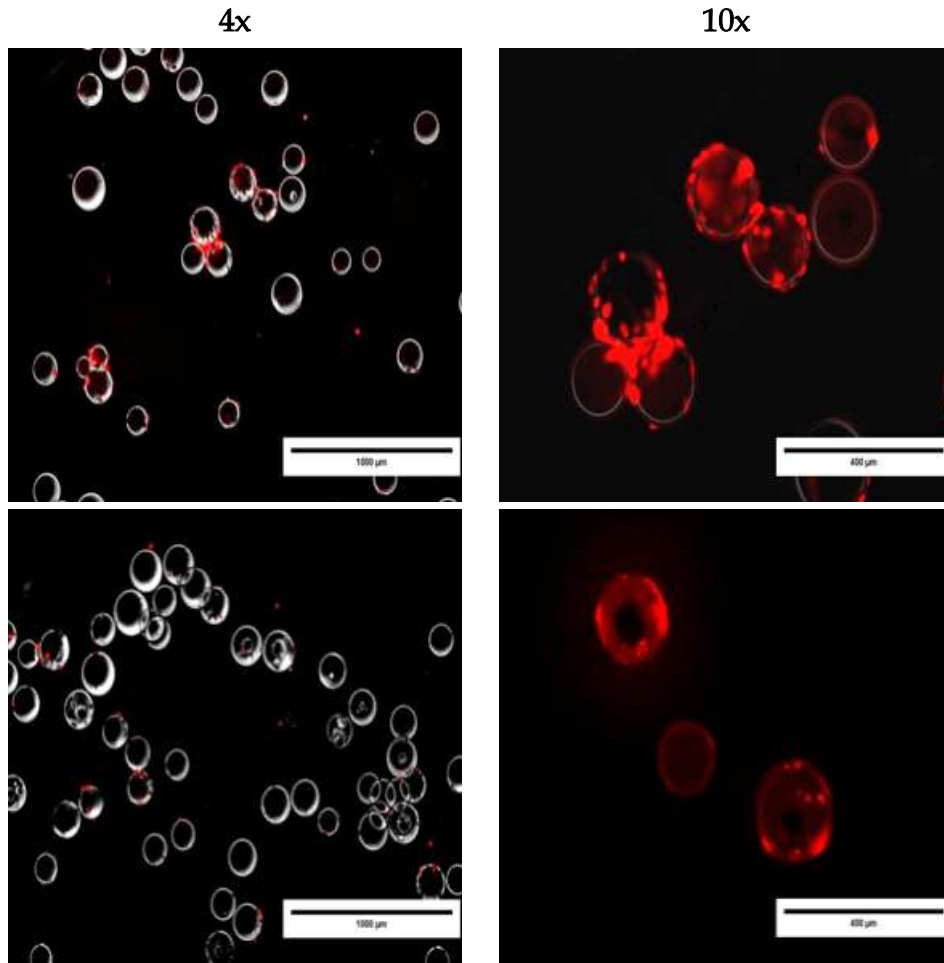


그림 47. Rhodamine-6G 염색을 통해 세포 부착 확인 결과

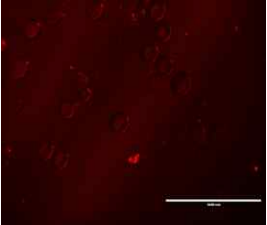
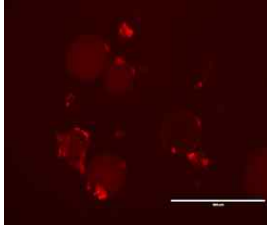

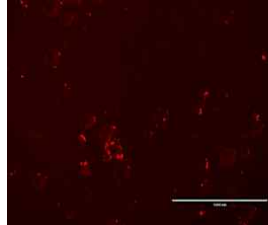


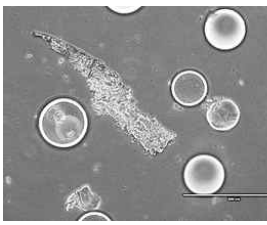
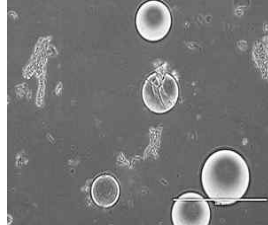
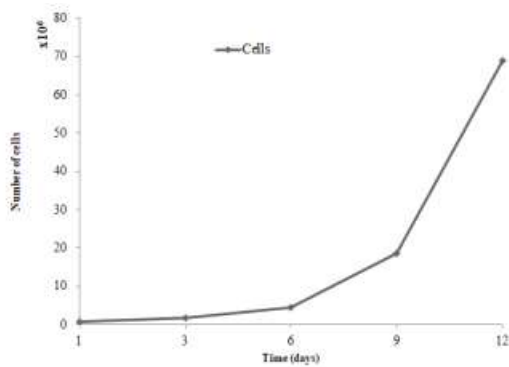
			
<그림>2D에서 3D로 옮긴 작업(1일차)	<그림>3D에서의 증식단계 (6일차)	<그림> 세포 분화 현상 (8일차)	<그림> 세포 분화 현상(9일차)
			
<그림> 세포 분화 현상 (12일차)	<그림> 세포 분화 현상 (15일차)	<그림> 트립신 후, 근육크기와 microcarrier 크기 비교 (15일차)	<그림> 트립신 후, 근육크기와 microcarrier 크기 비교 (15일차)

그림 48. 3D배양시 세포 증식단계에서 분화형태로 넘어가는 단계별 사진

- 3D 배양 시 세포들이 microcarrier에 부착하여 정상적으로 성장하는 모습을 관찰할 수 있었음. 배양이 진행됨에 따라 microcarrier에 부착된 세포들이 서로 붙어 하나의 cluster를

형성하는 것을 확인할 수 있었고, 이 과정이 세포 수를 더욱 더 늘리게 하는 것임을 확인함

- Rhodamine-6G 염색을 통해 세포의 부착 여부를 다시 한 번 확인할 수 있었음
- 배양 진행 중 1일, 3일, 6일, 9일, 12, 15일에 샘플을 일부 취한 뒤, Trypsinization을 진행 하고 나서 세포 수를 Hemocytometer를 이용해 확인함
- 15일 후에 세포의 크기와 microcarrier 크기에 대한 비교를 하였음. 15일차에서는 트립신을 진행하고 난 뒤, 일부 샘플을 획득하여 현미경으로 관찰한 결과임



Method	Doubling time (Days)
2D	2.43
3D	1.80

그림 49. 3D 배양 후 세포 수 결과 및 2D 배양의 doubling time 비교 결과

- 3D 배양 결과, 1~3 x 10⁶cell/mL 의 세포 수를 분주했지만, 1일차에선 6.75 x 10⁵cells/mL 만큼의 세포 수를 확인할 수 있었음. 이를 통해 일부 세포가 microcarrier에 부착되지 않음을 확인함. 그 후 3일차, 1.67 x 10⁶ cells/mL, 6일차 4.4 x 10⁶ cells/mL, 9일차 1.8 x 10⁷ cells/mL, 마지막으로 12일차에 6.8 x 10⁷ cells/mL의 세포 수를 확인할 수 있었음. 이를 2D 배양과 부피(mL) 대비 세포 수를 기반으로 doubling time을 계산했을 때, 3D 배양 방법이 주어진 시간 내에 더 많은 세포를 가질 수 있음을 확인함.

- 근육세포 이미지 및 성장발달관련 유전자 분석
- 유전자 분석을 위해 필요한 샘플은 분화되기 전의 세포와 분화된 세포 2가지로 나누어 RNA isolation을 진행함
- RNA isolation은 Accuzol Total RNA Extraction Reagent (Bioneer)를 이용한 Trizol method로 진행
- 준비된 RNA로 cDNA를 AccuPower CycleScript RT PreMix (Bioneer)와 PCR System 9700로 제작 (Synthesis step 45°C, 60분 → Heat inactivation step 95°C, 5분)
- qPCR은 AccuPower Greenstar qPCR MasterMix (Bioneer)와 StepOnePlus를 이용해 진행
- 사용된 Housekeeping gene으로 Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 사용, Target gene은 PAX7, MYOD1, PLAG1, FASN, MYOG, MHC 1을 사용했으며, primer의 sequence는 아래와 같음(표 5)

표 5. qPCR를 위한 Target gene과 housekeeping gene 목록

Gene	Primer sequence	References
GAPDH	F : 5'-ACTCTGGCAAAGTGGATGTTGTC-3'	(Li et al., 2019)
	R : 5'-GCATCACCCCACTTGATGTTG-3'	
PAX7	F : 5'-TGCCCTCAGTGAGTTCGATT-3'	(Li et al., 2019)
	R : 5'-CGGGTTCTGACTCCACATCT-3'	
MYOD1	F : 5'-CCGACGGCATGATGGACTA-3'	(Li et al., 2019)
	R : 5'-CTCGCTGTAGTAAGTGCGGT-3'	
PLAG1	F : 5'-GACTCTCCAGCATCCTCGTC-3'	(Littlejohn et al., 2011)
	R : 5'-GAAGAGTGTGCCTCCTCCTG-3'	
FASN	F : 5'-ACCTTGACACGGCTCAACTC-3'	(Kim et al., 2010)
	R : 5'-CACTGTGGCCATAGGTGGG-3'	
MYOG	F : 5'-AGAAGGTGAATGAAGCCTTCGA-3'	(Heras-Saldana et al., 2019)
	R : 5'-GCAGGCGCTCTATGTACTGGAT-3'	
MHC 1	F : 5'-CCCCTTCTCCCTGATCCACTAC-3'	(Baggerman et al., 2020)
	R : 5'-TTGAGCGGGTCTTTGTTTTTCT-3'	

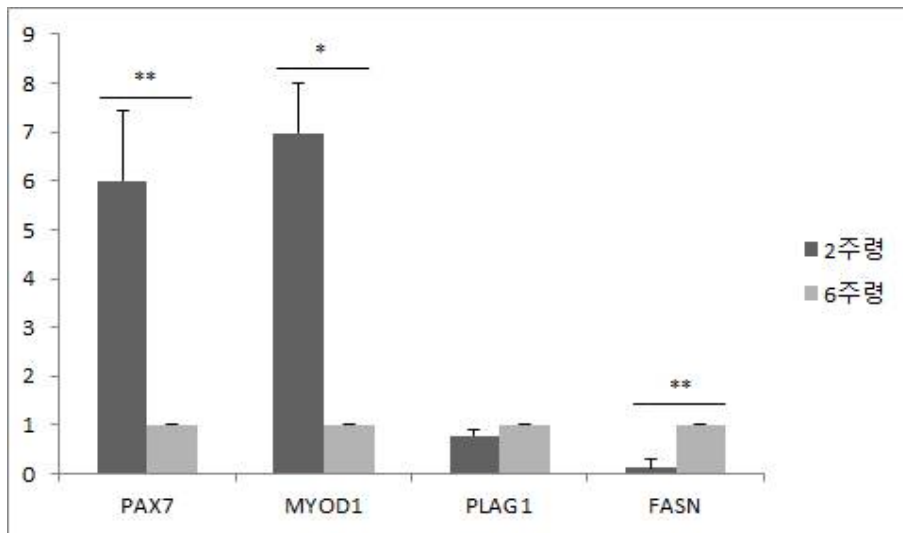


그림 50. 분화되지 않은 세포의 유전자 발현량 (*p<0.05, **p<0.01)

- 비교 결과, 분화되지 않은 세포에서는 PAX7, MYOD1, FASN의 발현량이 유의한 차이를 나타냈음. 2주령에서 추출된 세포에서 PAX7과 MYOD1이 더 높은 발현량을 나타낸 반면, FASN은 6주령에서 추출된 세포에서 더 많은 발현량을 나타냈음을 확인

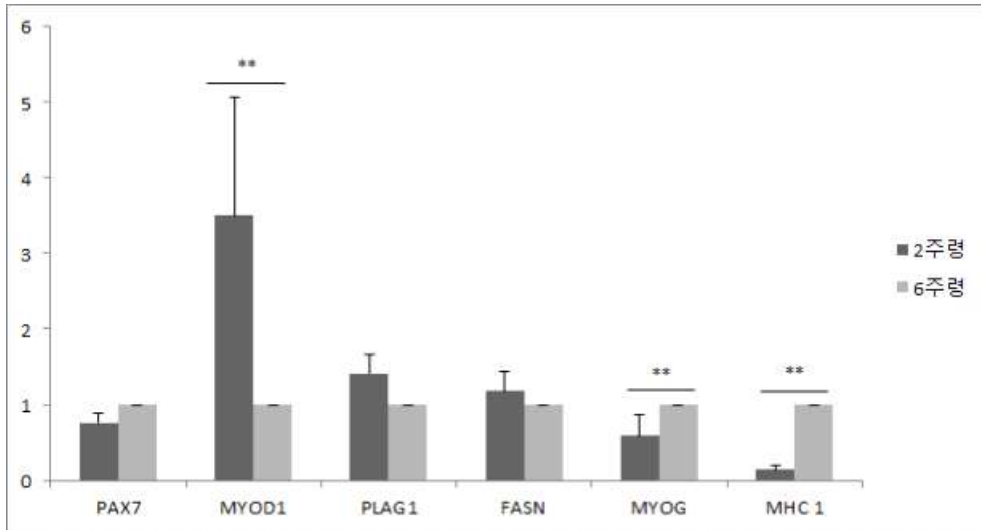


그림 50. 분화된 세포의 유전자 발현량 (*p<0.05, **p<0.01)

- 분화된 세포에서의 유전자 발현량은 다음과 같았음. 여기서는 MYOD1, MYOG, MHC 1에서 유의적인 차이를 보여주었는데, MYOD1이 2주령 근육에서 추출된 세포에서 더 많은 발현량을 나타낸 반면, MYOG와 MHC1에서는 6주령에서 추출된 세포가 더 많은 발현량을 나타냈음. 이 결과들을 통해 좀 더 높은 성장률을 보이는 세포에서 PAX7과 MYOD1의 발현량이 높게 나타난다는 것을 확인할 수 있었음. 그리고 도체의 지방 합성과 관련 있는 FASN의 발현량은 나이 많은 세포가 더 많은 발현량을 나타낸 것으로 보아, 6주령에서 추출된 세포에서 지방 합성이 더 많이 진행됐음을 알 수 있었음

- 2D와 3D의 유전자 분석 차이

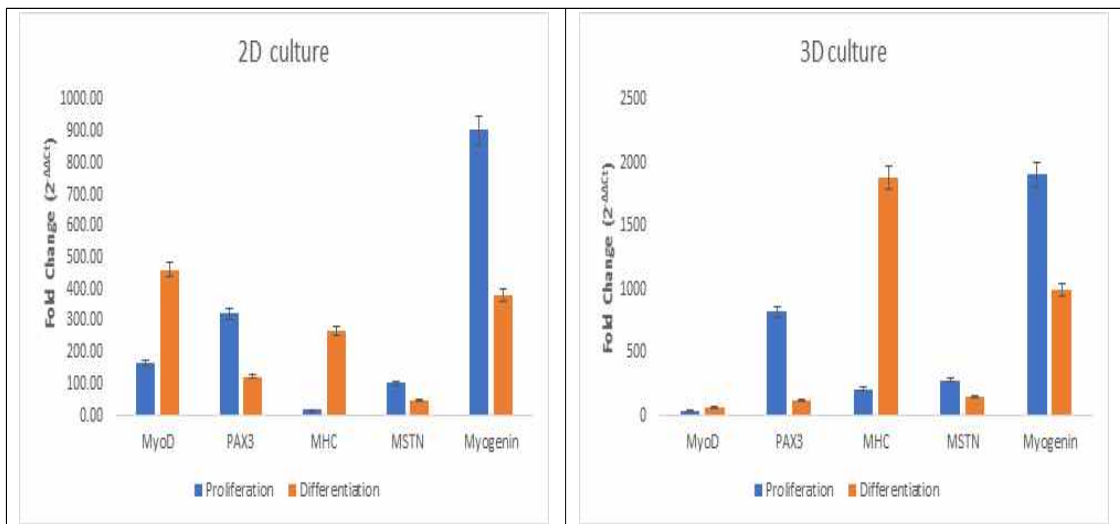


그림 51. 배양 gene expression

(좌) 2D 배양 (우) 3D 배양

- 분화되지 않은 세포와 분화된 세포를 토대로 유전자 분석 차이점을 해보았음. 2D 배양에서는 분화된 세포에서는 MyoD와 MHC가 분화되지 않은 세포에 비해서 높게 발현된 반면, PAX3, MSTN와 Myogenin에서는 분화되지 않은 세포에서 높게 발현되었음.

- 또한, 3D 배양에서도 분화되지 않은 세포와 분화된 세포간의 차이점을 비교 해보았음. 결과로는, 2D와 똑같은 유전자 발현이 나타나고 있음.
- 하지만, 2D와 3D의 차이점을 비교해보면 3D에서의 유전자 분석에 대한 발현 값이 2D보다는 높게 나온 현상을 확인 할 수 있음.

○ 배양돈육 시제품 개발 및 연구

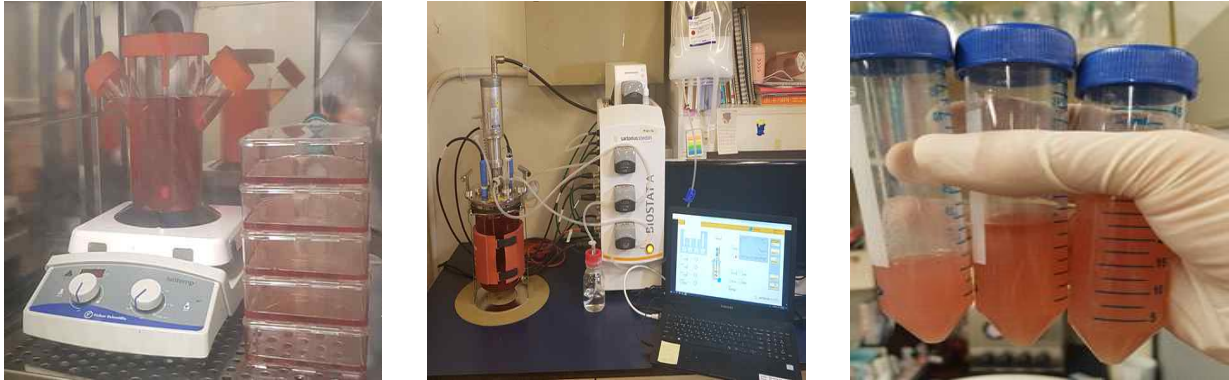


그림 52. Spinner Flask에서 Bioreactor로 옮긴 뒤, meat chunk로 만든 과정

- Meat chunk를 만들기 위한 단계

- Spinner Flask에서 세포와 지지체를 혼합한 뒤, 1일, 3일, 6일, 9일, 12일, 15일 순으로 세포 수를 알아보기 위하여 1mL 획득 후, 현미경으로 관찰. (세포수가 부족하면 추가적으로 Spinner Flask에 공급)
- 15일동안 관찰 한 뒤, microcarrier에 모든 세포들이 붙은 걸 확인이 되면, Bioreactor로 옮김.
- Bioreactor로 옮긴 후, 1일, 3일, 6일, 9일 순으로 세포 상태 확인 (현미경) 및 배지 교체 작업을 하여, 10일에는 상층액을 제거한 후, Trypsin-EDTA 용액을 넣은 뒤, incubator에서 5분간 방치
- 5분간 incubator에 방치 후, 현미경으로 세포들이 microcarrier에서 분리 되었는지 확인 후 세포끼리 모으면 meat chunk가 됨
- 옮긴 meat chunk에 적색소 myoglobin을 첨가 후 식육고기의 색깔과 유사한 형태로 제작

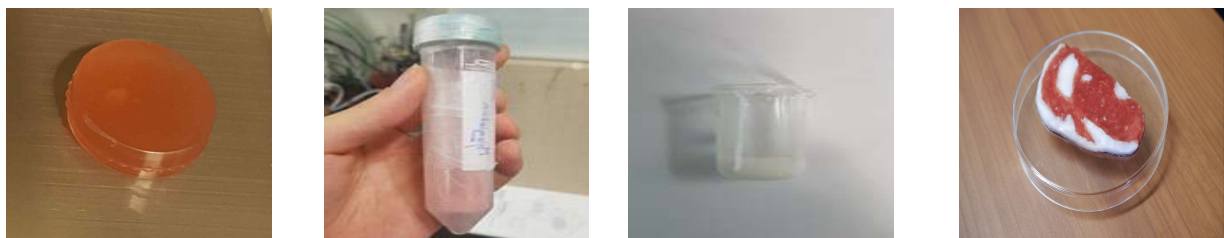


그림 53. Meat chunk, myoglobin, 젤레이터, 배양돈육시제품 (좌부터)

- 바이오리액터에서 3D 배양기법을 이용하여 돼지 근육세포를 배양하고 배양육 색깔 구현을 위해 적색소 myoglobin을 이용하여 배양육 제작하였음. 또한, 식육고기 지방의 형태를 구축하기 위하여 배양육에는 젤레이터 기반 지방을 이용하여 스테이크형 배양돈육 시제품을 생산하였음.

- 본 시제품의 구성비율은 세포 75%, 젤레이터 기반의 지방 15% 형태를 구축하였으며, 이는 식육 돼지고기에서의 근육 (70-90%), 지방 (5-20%), 결합조직 (1-15%)을 유사하게 구축하였음.

<제1협동연구기관 서울대학교>

[1년차]

○ 돼지 배아줄기세포주 확립 및 특성화 작업

- 근육세포의 발달 및 분화 기작을 이해하기 위해서는 우선적으로 그 재료가 되는 돼지 배아줄기세포의 분자생물학적 특징에 대해 이해하는 것이 필수적임. 이를 위하여 돼지 배아줄기세포주의 만능성 마커 확인, 유전체 분석 및 체내외 분화능 검증을 실시하였음
- 본 실험을 진행하기 위하여 32개의 처녀생식란과 42개의 체외수정란에서 각각 7개와 11개의 돼지 배아줄기세포주를 확립하였음. 이중 특성분석을 위하여 무작위로 5개의 세포주 (세포주 이름: PG-ES3, PG-ES-7, PG-ES-8, IVF-ES-11, IVF-ES-12)를 선별하여 분자생물학적 특성 및 분화 능력검증을 시도함
- 돼지 배아줄기세포주는 사람의 배아줄기세포와 유사한 납작한 군집형태를 띠었고, 알칼라인 포스파타아제의 활성을 지니고 있음. 핵형 검사 결과 1개의 세포주(IVF-ES-12)를 제외하고 정상적인 핵형을 지니고 있었음(그림 54)

(A) 돼지 배아줄기세포 군집의 형태학적 특징



(B) 알칼라인 포스파타아제 염색 결과



(C) 핵형분석결과

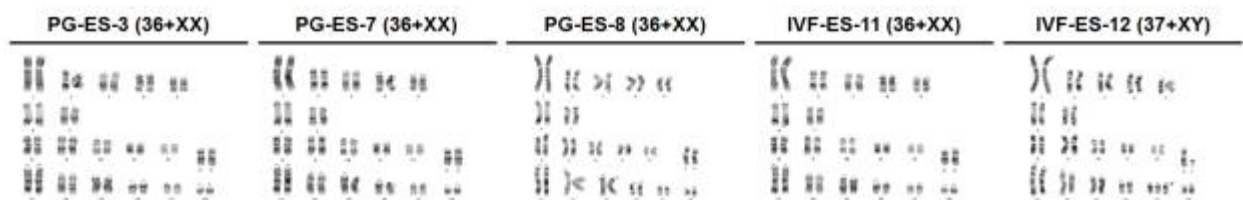


그림 54. 돼지 배아줄기세포의 특징

- 면역학적 염색법을 통해 확인한 결과, 만능성 마커인 OCT4, SOX2, NANOG 등이 섬유아 세포와 비교하여 특이적으로 발현하는 것을 확인함(그림 55)

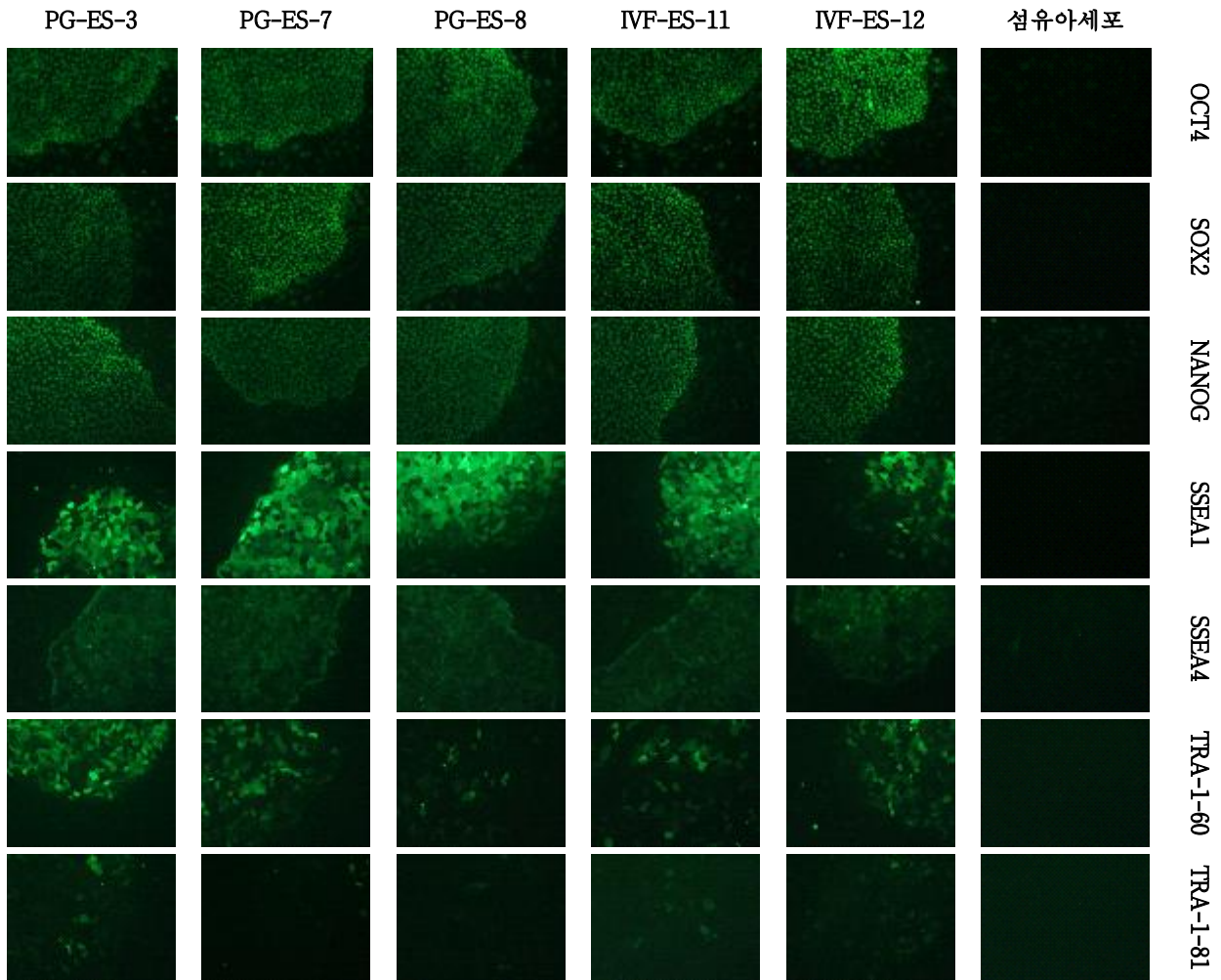


그림 55. 돼지 배아줄기세포에서 만능성 마커 양상

- 전사체 분석 결과를 통해 섬유아세포와 배타적으로 확립된 돼지 배아줄기세포주간 높은 상관관계를 보이는 것을 확인하였고, 체세포와 달리 만능성 유지에 관여하는 유전자들 (POU5f1, SOX2, NANOG, ZFP42, LIN28, SALL4)의 발현이 높은 것을 확인하였음

(A) 돼지 배아줄기세포간의 상관관계 분석

(B) 만능성 관련 유전자의 발현량 분석

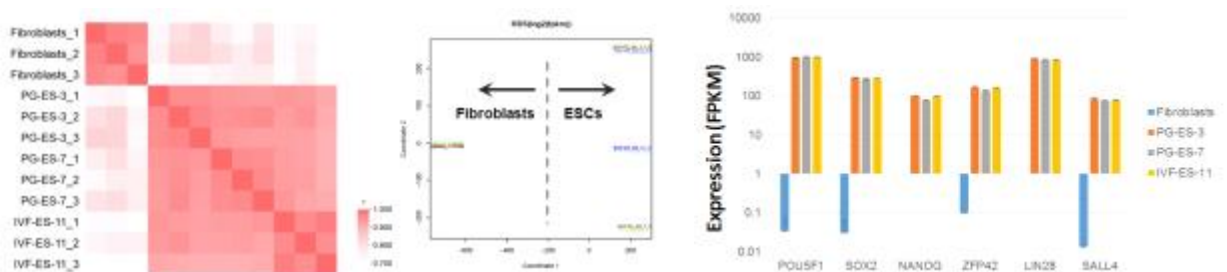
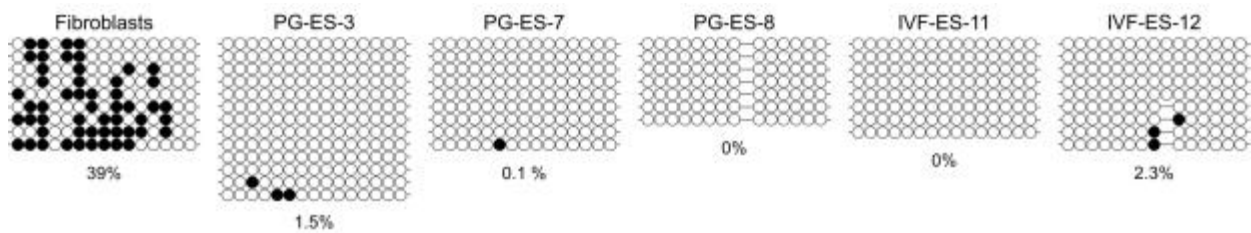


그림 56. 돼지 배아줄기세포의 전사체 분석

- DNA에 메틸기가 붙으면 후생 유전학적으로 해당 위치에 존재하는 유전자의 발현이 억제 가 됨. 때문에 DNA상의 특정 위치에서 DNA 메틸화 정도를 확인하면 해당 유전자의 발 현조절을 확인할 수 있음. 따라서 만능성과 관련된 OCT4, XIST 유전자를 선별하여 해당 유전자위의 DNA 메틸화 정도를 확인하였음. 그 결과 OCT4의 경우, 체세포에서는 메틸화 되어 있던 유전자가 배아줄기세포에서는 탈메틸화가 되어 OCT4의 발현이 증가했음을 알 수 있었음. 또한 X 염색체 불활성화에 관여하는 XIST는 모든 배아줄기세포주에서 비활성 화 되어 X 염색체의 불활성화가 줄기세포에서는 억제되는 것을 확인하였음(그림 57)

(A) OCT4 프로모터부위



(B) XIST 프로모터 부위

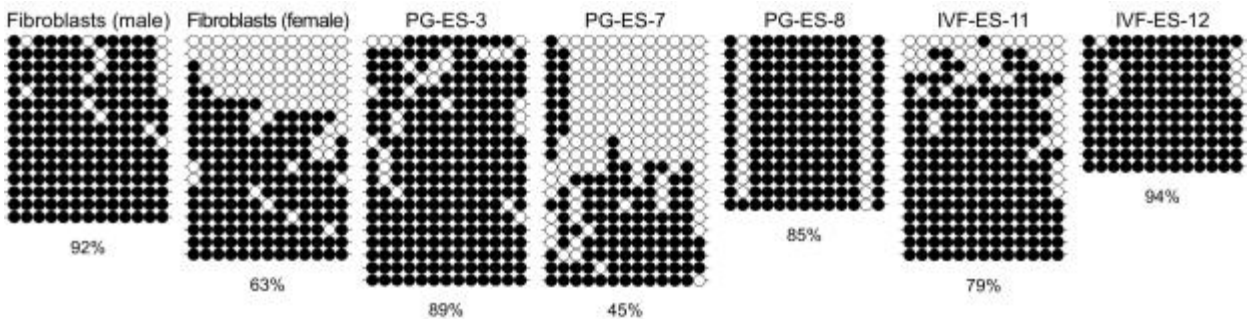


그림 57. 돼지 배아줄기세포의 후생유전학적 특징

- 만능성이 확인된 돼지 배아줄기세포주를 이용하여 분화능을 검증하기 위하여 3가지 방법 을 사용하였음. 첫 번째로 배아체를 형성하여 무작위로 분화를 시킨 후에 다양한 세포의 표지 유전자의 발현을 확인하여 체외 분화능을 검증함. 각각의 돼지 배아줄기세포주는 부유배양을 실시하였을 때, 배아체를 형성하였고 이를 젤라틴이 코팅된 배양접시로 옮겨 배양을 진행하여 추가 분화를 진행하였음. 줄기세포로부터 분화가 된 세포들에서 다양한 조직의 표지 인자들이 발현하는 것을 확인하였음(그림 58). 이를 통해 돼지 배아줄기세포 주가 체외에서 다양한 세포로 분화 가능함을 증명하였음
- 두 번째로 돼지 배아줄기세포를 우리가 원하는 특정 세포로 분화유도가 가능한지를 확인 하였음. 그 결과 돼지 배아줄기세포주는 신경세포, 내배엽, 심근 세포로 유도 분화가 가 능하였음. 신경세포의 경우 고유의 형태학적 특징 및 표지인자(ZO-1)을 발현하였고, 내배

엽세포는 표지인자인 SOX17, GATA4, CSCR4를 발현하였음. 또한 분화된 심근세포는 주기적으로 수축이완 운동을 하는 것을 관찰하였음(그림 59)

(A) 배아체의 형태학적 특징 (B) 분화마커 확인

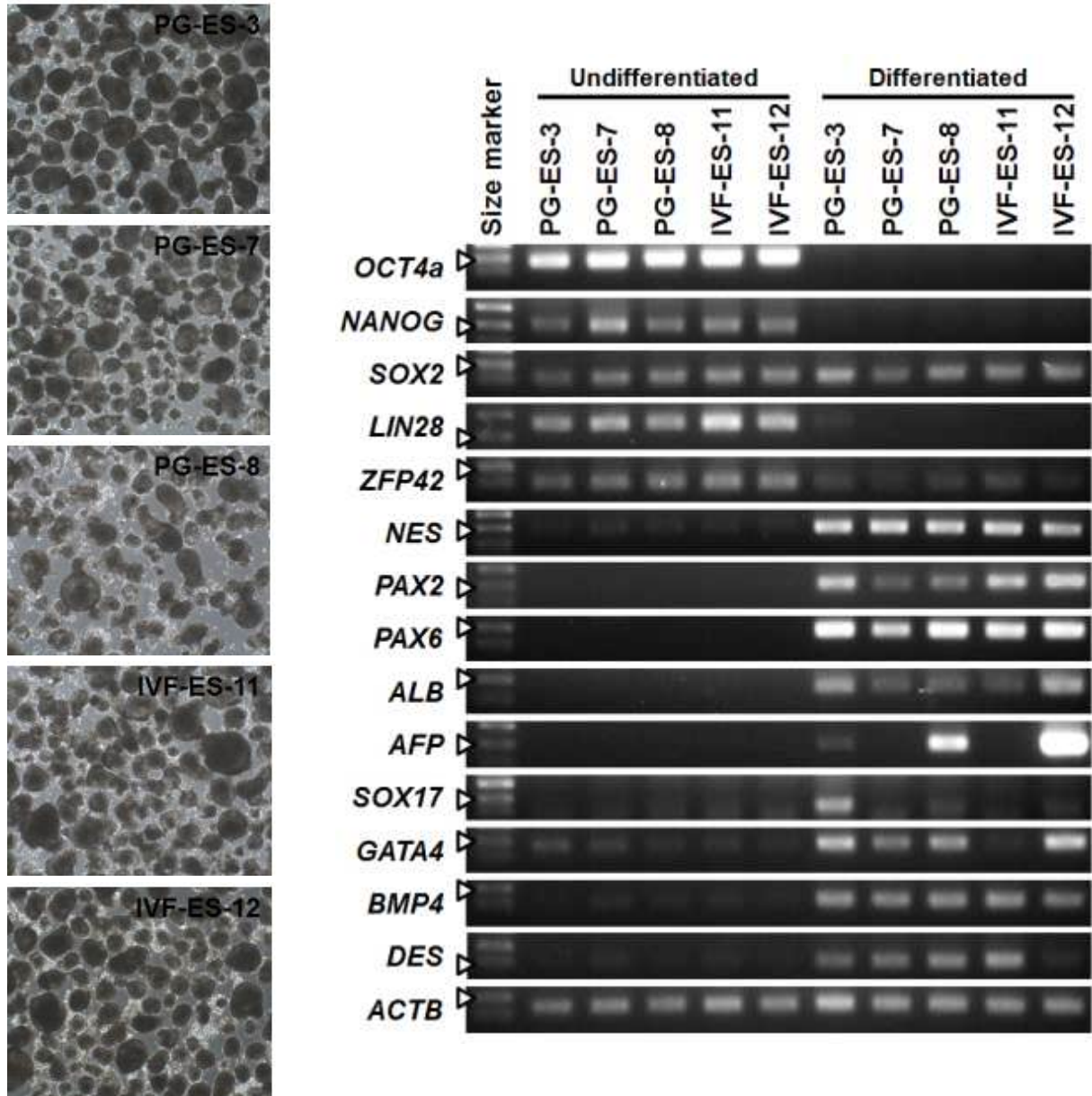
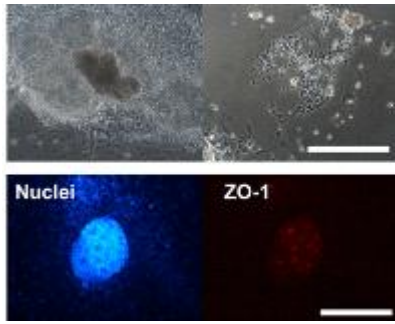
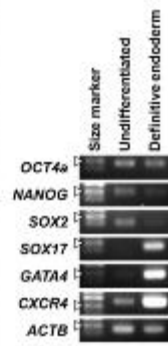
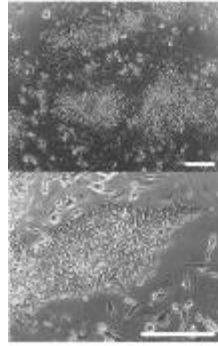


그림 58. 돼지 배아줄기세포의 체외 분화능 검증

(A) 신경세포



(B) 내배엽



(C) 심근세포

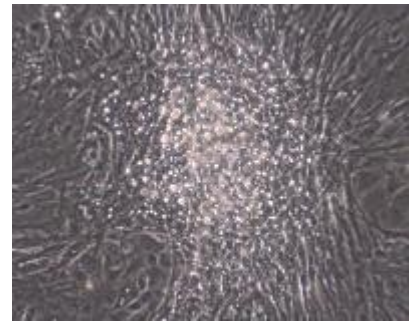
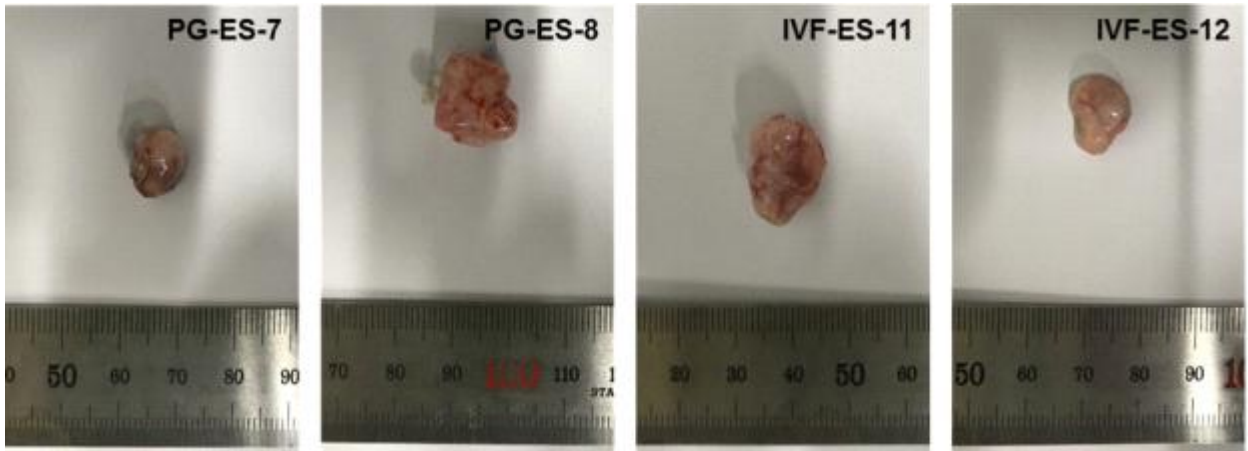


그림 59. 돼지배아줄기세포의 유도분화능 검증

- 세 번째로 돼지 배아줄기세포주가 체내에서 분화가 가능한지를 확인하기 위하여 기형종 형성능 검증을 진행하였음. 배아줄기세포주를 누드마우스의 피하에 주입하고 2-3달이 지났을 때, 1-2 cm 의 기형종이 발견이 되었고 이를 적출하여 고정을 진행하였음. 각각의 기형종은 유전자형 분석을 통해 주입한 돼지 배아줄기세포로부터 유래 한 것을 확인하였고, 조직학적 분석 결과 3배엽성 다양한 조직들로 분화가 된 것을 확인하였음(그림 60)

(A) 돼지 배아줄기세포로부터 형성된 기형종



(B) 기형종의 조직학적 분석결과

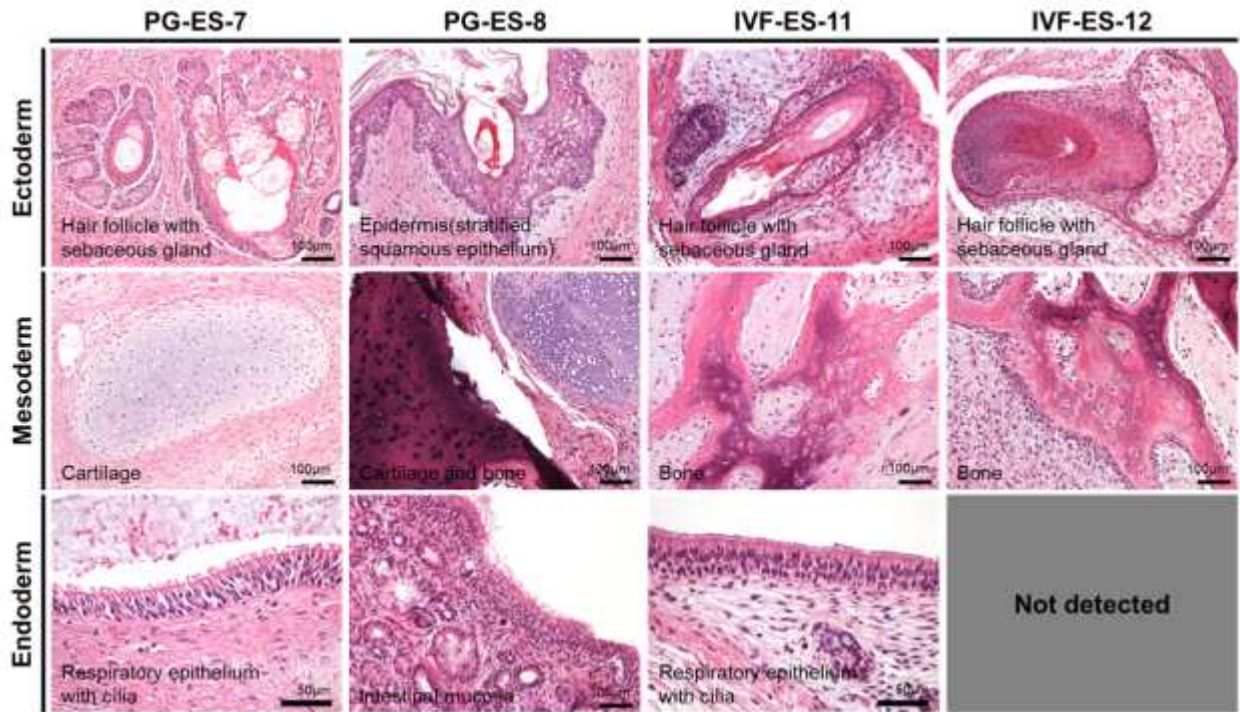


그림 60. 돼지 배아줄기세포의 체내분화능 검증

- 마지막으로 확립한 돼지 배아줄기세포주의 발생학적 특성을 확인하기 위하여 착상전 배아의 내부세포피와 상배엽과의 전사체 비교분석을 실시하였음. 그 결과, 돼지 배아줄기세포주는 착상전 배아의 내부세포피 보다는 조금더 발달된 형태인 상배엽과 유전자의 발현양상이 비슷함을 확인하였음. 또한 만능성 유전자 및 분화관련 유전자만을 선별하여 비교한 결과, 상배엽과 유사한 특징을 보임(그림 61). 이를 바탕으로 상배엽으로부터 근육줄기세포의 발달과정을 분석하여 분화 기법을 개발하였음

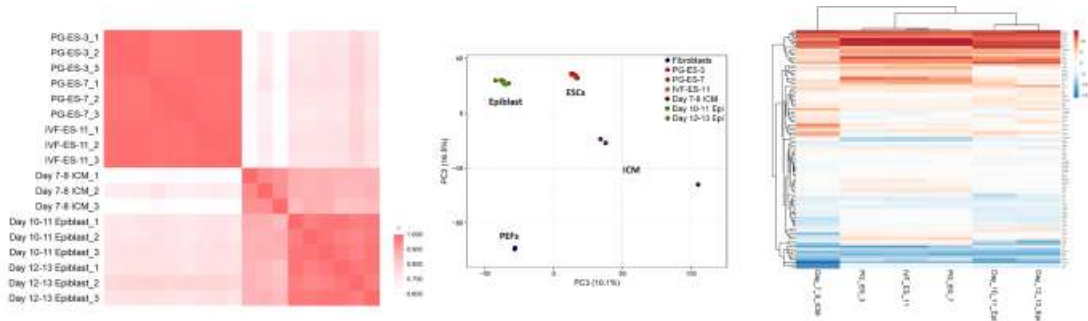


그림 61. 돼지 착상전 배아와 배아줄기세포주의 전사체 비교 분석

[2년차]

○ 근육/지방 분화에 관여하는 인자 발굴 및 선별

- 앞서 확립한 돼지 배아줄기세포로 근육 분화를 진행하기 위하여 문헌 조사를 통해 근육 발달에 관여하는 신호 전달 인자들을 선별하였음. 초기배아의 상배엽 조직은 외배엽, 중배엽, 내배엽으로 발달하여 다양한 조직으로 분화하여 태아를 형성함. 이때, 중배엽 조직으로부터 근육 세포가 발달을 함. 중배엽 조직은 크게 측판중배엽과 축방중배엽으로 나뉨. 측판중배엽은 몸의 간층조직 및 뼈로 분화를 하고, 축방 중배엽은 골격근으로 발달을 함. 이 두 개의 중배엽은 BMP4 에 의존도가 달라서 높은 농도의 BMP4에서는 측판 중배엽으로 발달하고, BMP4의 자극이 없으면 축방 중배엽으로 발달함. 따라서 배아줄기세포로부터 골격근을 얻기 위해서는 BMP4 의 억제이 필수적임(그림 62)

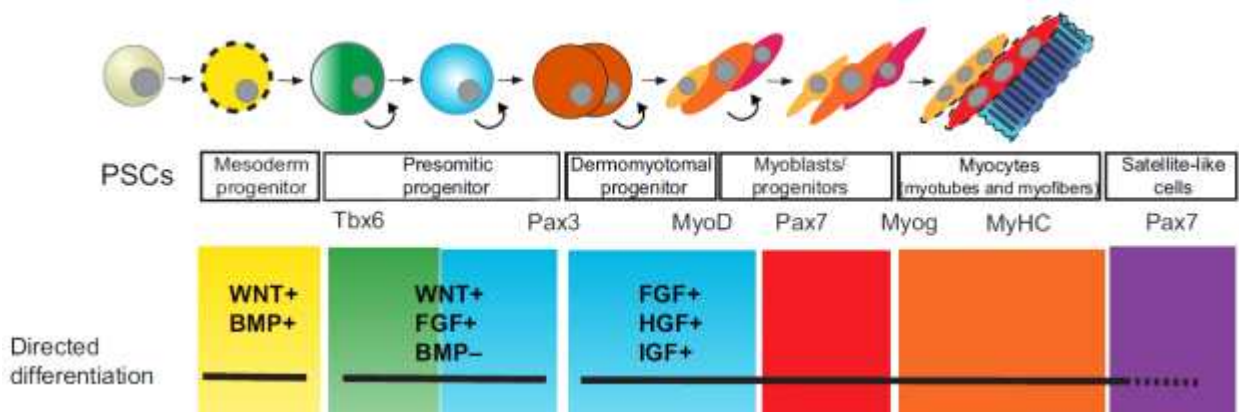


그림 62. 근육발달에 관여하는 신호전달 인자들

- 또한 분화된 근육 위성세포는 체내에서는 성장 정지된 상태로 존재를 함. 이때 근육의 손상이나 외부의 자극이 발생하면 분열이 가능한 줄기세포 형태인 근아세포로 발달하여 근육 생성에 관여를 함(그림 63)

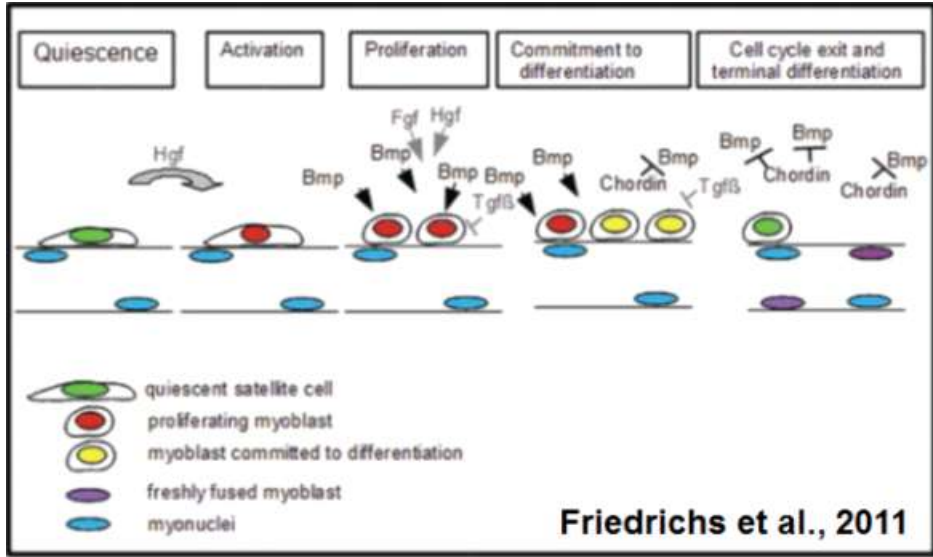


그림 63. 근육 줄기세포의 체내 발달 모식도

- 근육줄기세포의 체외배양 조건을 최적화 하기 위하여 근육줄기세포의 성장에 관여하는 성장인자들을 문헌조사를 통해 선별하였고, 일부 데이터는 논문화 하여 Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety지에 총설논문을 게재하였음(그림 64; 2019 JCR 기준 IF:9.912, 상위 1.5% 이내, Food Science & Technology분야 2/139위).

(A) 배양육의 생산 과정 모식도

(B) 근육줄기세포 성장에 관여하는 성장인자 리스트 (일부 발췌)

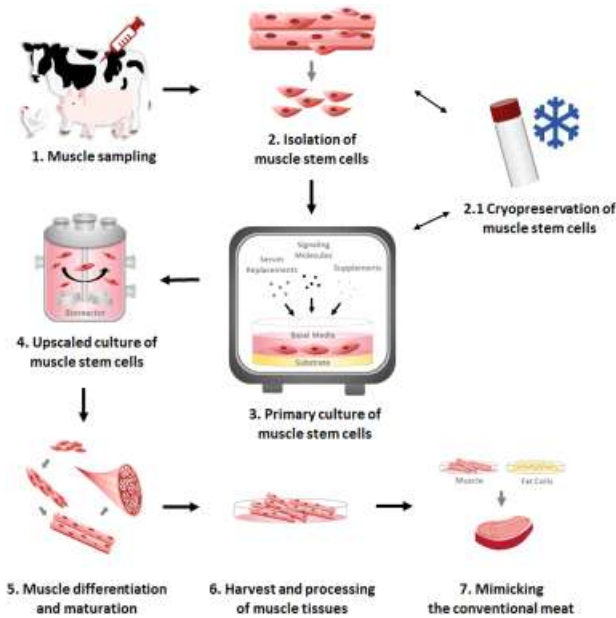


Table 1: Summary of culture conditions for muscle stem cells

Species	Substrate	Seed source	System	Culture	Media/Condition	Signaling molecules	Temperature	Substrate	Reference
Porcine	Collagen	SVF	2D	CD34+	DMEM + 10% FBS	None	37°C	None	Wang et al. (2017)
Porcine	Collagen	SVF	2D	CD34+	DMEM + 10% FBS	None	37°C	None	Wang et al. (2017)
Porcine	Collagen	SVF	2D	CD34+	DMEM + 10% FBS	None	37°C	None	Wang et al. (2017)
Porcine	Collagen	SVF	2D	CD34+	DMEM + 10% FBS	None	37°C	None	Wang et al. (2017)
Porcine	Collagen	SVF	2D	CD34+	DMEM + 10% FBS	None	37°C	None	Wang et al. (2017)
Porcine	Collagen	SVF	2D	CD34+	DMEM + 10% FBS	None	37°C	None	Wang et al. (2017)
Porcine	Collagen	SVF	2D	CD34+	DMEM + 10% FBS	None	37°C	None	Wang et al. (2017)
Porcine	Collagen	SVF	2D	CD34+	DMEM + 10% FBS	None	37°C	None	Wang et al. (2017)
Porcine	Collagen	SVF	2D	CD34+	DMEM + 10% FBS	None	37°C	None	Wang et al. (2017)
Porcine	Collagen	SVF	2D	CD34+	DMEM + 10% FBS	None	37°C	None	Wang et al. (2017)

TABLE 1 | Continued

Species	Substrate	Seed source	System	Culture	Media/Condition	Signaling molecules	Temperature	Substrate	Reference
Porcine	Collagen	SVF	2D	CD34+	DMEM + 10% FBS	None	37°C	None	Wang et al. (2017)
Porcine	Collagen	SVF	2D	CD34+	DMEM + 10% FBS	None	37°C	None	Wang et al. (2017)
Porcine	Collagen	SVF	2D	CD34+	DMEM + 10% FBS	None	37°C	None	Wang et al. (2017)
Porcine	Collagen	SVF	2D	CD34+	DMEM + 10% FBS	None	37°C	None	Wang et al. (2017)
Porcine	Collagen	SVF	2D	CD34+	DMEM + 10% FBS	None	37°C	None	Wang et al. (2017)
Porcine	Collagen	SVF	2D	CD34+	DMEM + 10% FBS	None	37°C	None	Wang et al. (2017)
Porcine	Collagen	SVF	2D	CD34+	DMEM + 10% FBS	None	37°C	None	Wang et al. (2017)
Porcine	Collagen	SVF	2D	CD34+	DMEM + 10% FBS	None	37°C	None	Wang et al. (2017)
Porcine	Collagen	SVF	2D	CD34+	DMEM + 10% FBS	None	37°C	None	Wang et al. (2017)
Porcine	Collagen	SVF	2D	CD34+	DMEM + 10% FBS	None	37°C	None	Wang et al. (2017)

그림 64. 가축의 근육줄기세포 배양을 통한 배양육 생산 (최 등, 2020)

○ 돼지 배아줄기세포주의 근육 분화 및 소태아혈청 대체제 테스트

- 앞선 전사체 분석을 통해 본 연구진에서 확립한 돼지 배아줄기세포주는 착상전 배아의 상배엽과 유사한 상태임을 확인하였음. 이를 바탕으로 문헌 조사를 통해 상배엽으로부터 근육 분화에 관여하는 신호 전달 인자들을 선별하였음. 상배엽 조직은 외배엽, 중배엽, 내배엽으로 발달하여 다양한 조직으로 분화하여 태아를 형성함. 이때, 중배엽 조직으로부터 근육 세포가 발달을 함. 중배엽 조직은 크게 측판중배엽과 측방중배엽으로 나뉨. 측판 중배엽은 몸의 간층조직 및 뼈로 분화를 하고, 측방 중배엽은 골격근으로 발달을 함. 이 두 개의 중배엽은 BMP4 에 의존도가 달라서 높은 농도의 BMP4에서는 측판 중배엽으로 발달하고, BMP4의 자극이 없으면 측방 중배엽으로 발달함. 따라서 배아줄기세포로부터 골격근을 얻기 위해서는 BMP4 의 억제가 필수적임
- 이에 근육 분화의 첫 단계인 측방 중배엽로 배아줄기세포주를 유도하기 위하여 BMP4 신호 전달체계의 억제제중 하나인 LDN-193189와 측방 중배엽로 분화를 돕는 WNT 신호 전달 체계를 활성화 시키는 CHIR99021를 처리하였음. 또한 소태아혈청을 대체하기 위하여 시중에 판매되고 있는 대표적인 혈청대체제인 knockout serum replacement (KSR)의 테스트를 진행하였음
- 먼저 소태아혈청을 제거한 그룹과 혈청대체제인 KSR을 처리한 그룹을 비교분석하였음. 그 결과 혈청이 완전히 제거된 그룹에서는 세포의 성장률 및 생존율의 감소가 두드러졌음. 일부 살아남은 세포가 6일차에 근육이 아닌 내배엽성 세포로 분화가 유도되었음. 하지만 혈청대체제인 KSR을 첨가한 배양액에서 세포의 성장률 및 생존율의 감소는 보이지 않았음(그림 65)
- 돼지 배아줄기세포를 측방 중배엽으로 분화 유도를 시킨 후에 다양한 배양 조건에서 분화 시킨 세포에서 측방 중배엽 마커 유전자의 발현을 확인하였음. 그 결과, 혈청을 완전히 제거하여 배양한 실험군에서는 중배엽성 마커 유전자들이 모두 감소를 하였고, BMP4 신호전달체계가 불완전하게 억제된 것을 확인하였음. 하지만 혈청대체제인 KSR을 포함한 배양액에서 분화 시킨 실험군은 중배엽성 유전자와 측방 중배엽의 마커 유전자가 높게 발현하는 것을 확인하였고, BMP4 신호전달체계가 효율적으로 억제되는 것을 확인하였음. 또한 다양한 농도로 LDN193189와 CHIR99021을 처리하여 가장 효율적인 분화 조건을 확립하였음(그림 66)

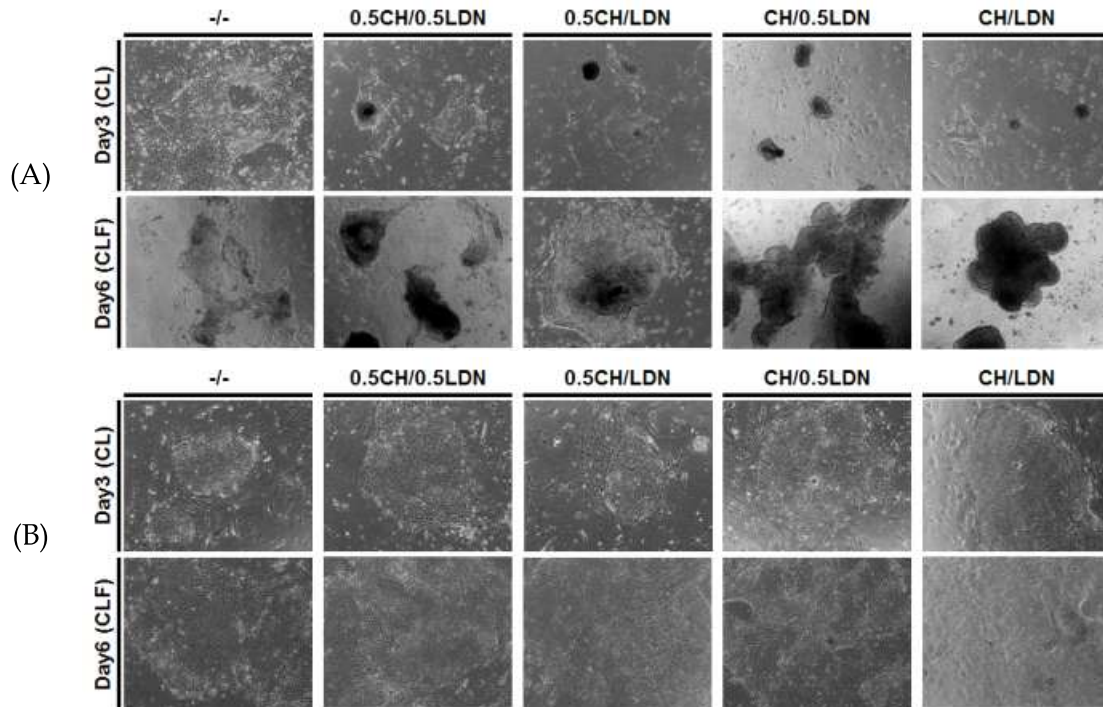


그림 65. 돼지 배아줄기세포주의 축방 중배엽으로의 분화 유도

(A) 소태아 혈청이 제거된 배양액에서 분화를 유도한 돼지 배아줄기세포주

(B) 혈청대체제 KSR을 처리한 배양액에서 분화를 유도한 돼지 배아줄기세포주

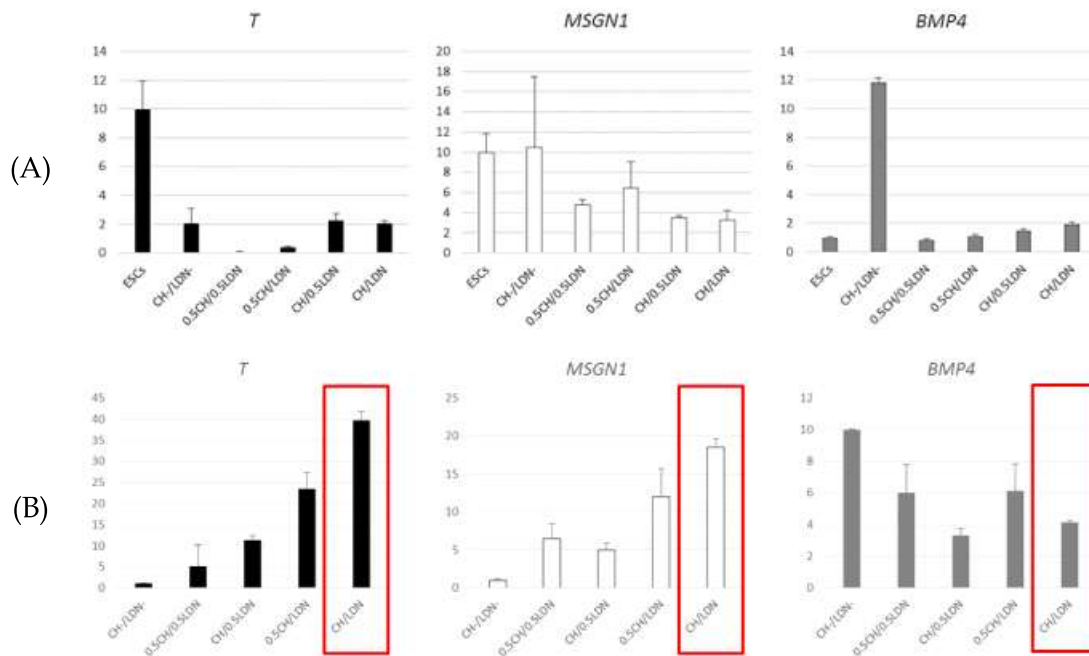


그림 66. 돼지 배아줄기세포주의 축방 중배엽으로 분화시

조건별 유전자 발현 변화 양상

(A) 소태아 혈청이 제거된 배양액에서 분화를 유도한 돼지 배아줄기세포주

(B) 혈청대체제 KSR을 처리한 배양액에서 분화를 유도한 돼지 배아줄기세포주

- 축방 중배엽으로의 분화 조건을 확립한 이후에 근육 전구세포로의 분화를 유도하였음. 축방 중배엽에서 근육 전구 세포로 분화를 유도한다고 알려진 HGF, IGF, FGF2를 순차적으로 조합을 이루어 처리를 하였음 (K-HIFL: KSR+HGF+IGF+FGF2+LDN193189, KI: KSR+IGF). 그 결과, 근육 분화 13일째 다양한 구조의 세포의 모습이 관측이 되었고, 일부의 세포를 추출하여 SkGM-1 배양액에서 배양을 진행하였음(그림 67A)
- 이들 세포로부터 PCR 기법을 통해 유전자 발현을 확인한 결과, 근육분화에 관여하는 유전자의 발현이 근육 분화 13일째 세포와 이로부터 일부 추출하여 SkGM-2에서 배양한 세포에서 증가한 것을 확인하였음(그림 67B)

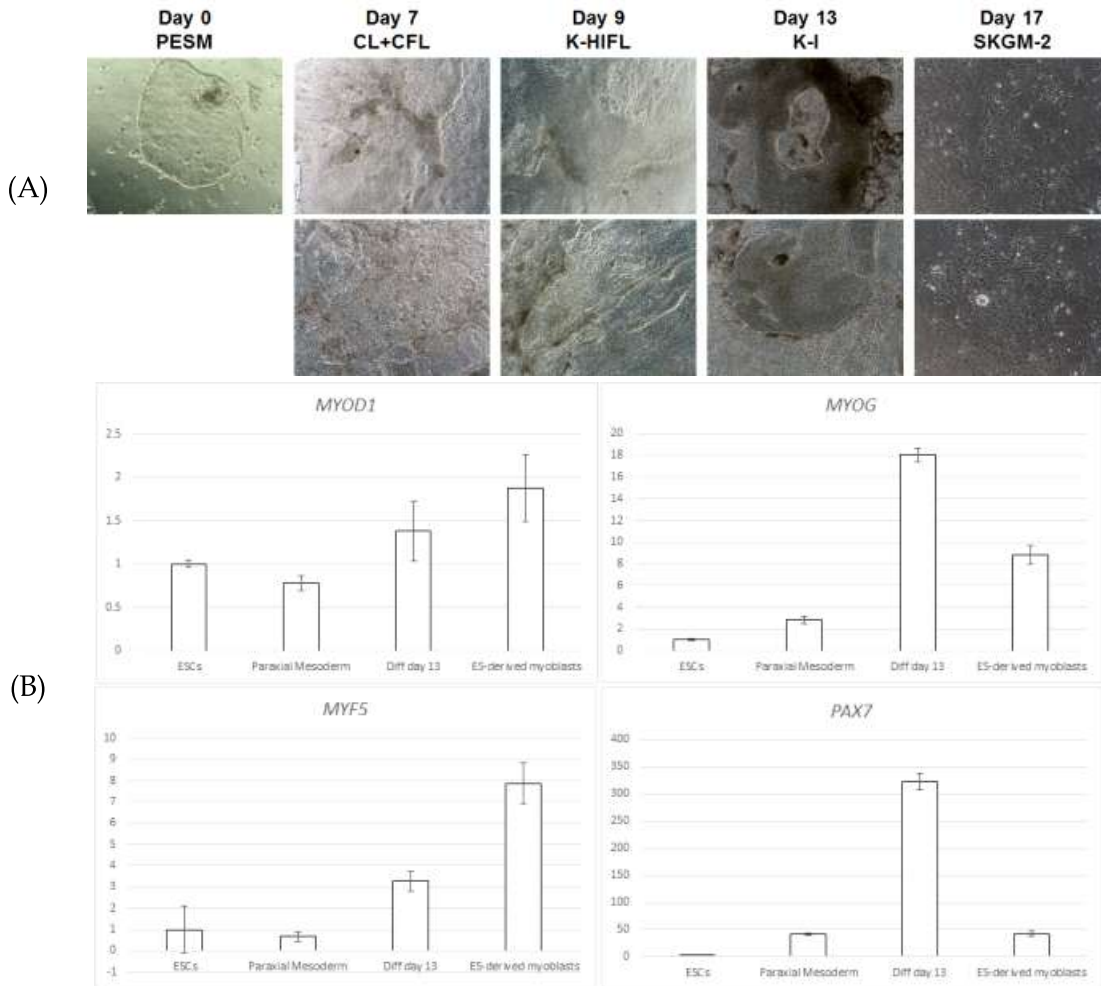


그림 67. 돼지 배아줄기세포주의 근육 전구세포로의 분화 유도

(A) 돼지 배아줄기세포주로부터 근육 전구세포로의 분화시 형태학적 특징

(B) 분화된 근육 전구세포의 근육 분화 관련 유전자의 발현 양상

[3년차]

○ MyoD1 과발현을 통한 돼지 섬유아세포주의 근육 분화 유도

- MyoD1 단백질의 아미노산 서열의 비교를 통하여 돼지의 MyoD1도 기존에 연구가 많이 진행된 생쥐를 비롯하여 다양한 종의 유전자와 기능적으로 유사성을 확인하였음. 그 결과, 단백질의 아미노산 서열은 다른 종 (생쥐, 사람, 말, 소, 양)과 높은 수준의 유사성을 보였고, 소와 양의 단백질과 98.1%로 가장 높은 유사성을 보였음(표 6)

표 6. 돼지와 다양한 종간 MyoD1 단백질의 유사성 비교 분석 (%)

	생쥐	사람	말	소	양
전체 단백질	89.03	93.12	94.36	95.92	95.61
Acidic	92.59	92.59	98.15	100.00	100.00
H/C	89.19	97.30	89.19	100.00	100.00
bHLH	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Helix3	92.86	92.86	92.86	92.86	92.86

- 생쥐의 MyoD 단백질에는 3개의 기능적 도메인 구조가 존재하는 것이 밝혀짐. 핵의 정위 (Localization)와 근분화에 관계하는 basic domain, MyoD의 이합체화 및 DNA 결합에 관여하는 HLH motif, 근분화의 개시에 관계하는 Myf5 domain이 존재함. 이러한 연구를 바탕으로 돼지의 MyoD1 단백질의 아미노산 서열에 존재하는 도메인 구조를 비교 분석하였음. 그 결과, basic domain과 HLH motif는 모든 종에서 동일 한 것으로 확인이 되었고, Myf5 domain의 경우 생쥐를 제외한 나머지 종에서 97% 이상의 높은 유사성을 보임(그림 67). 결과적으로, 생쥐와 돼지의 MyoD1은 근육의 분화 및 유도에 있어 같은 기능을 할 것으로 예상됨

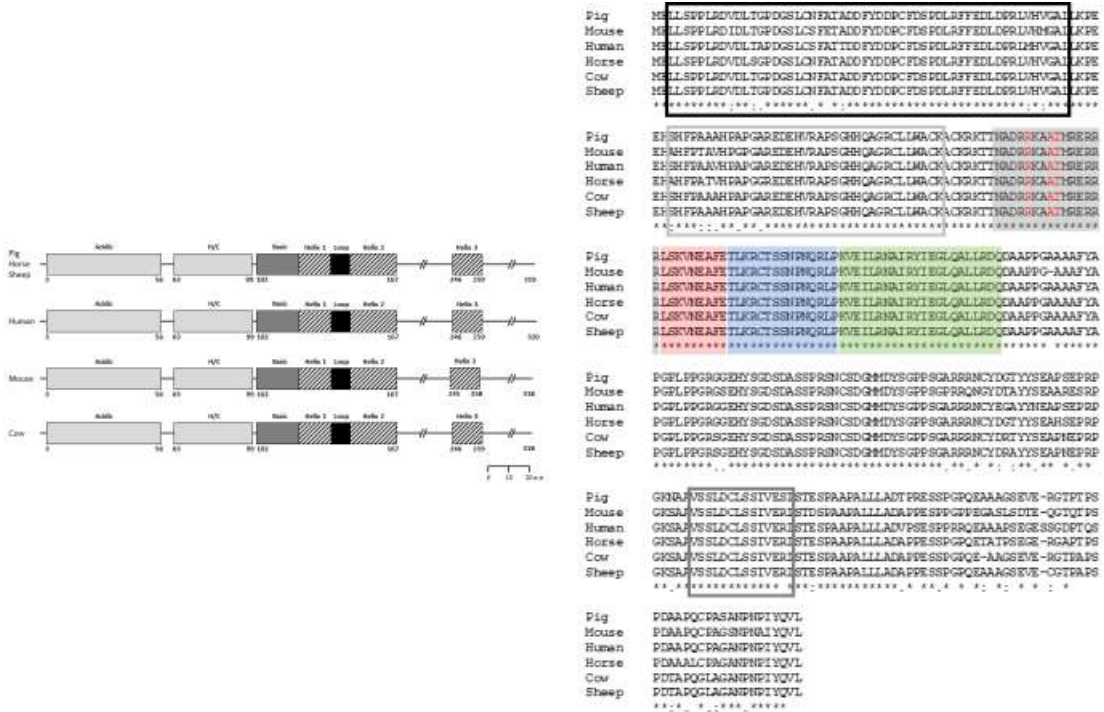


그림 68. 단백질의 아미노산 서열 확인을 통한 다양한 종과 돼지의 MyoD1 유전자 상동성 확인

- 근육 분화에 있어 MyoD1 유전자의 역할 규명을 위하여 돼지 태아 섬유아세포를 이용하여 과발현 실험을 진행하였음. MyoD1 유전자가 도입된 세포들은 근아세포의 성장에 관여하는 신호전달 물질인 FGF2, SB431542, CHIR99021이 다양한 조합으로 포함된 배양액에서 배양을 하였음. 또한 MyoD1을 유도 발현시키기 위하여 Doxycycline을 처리하였고, 배양 6일째부터는 제거를 하여 외래유전자의 발현을 중단하였음

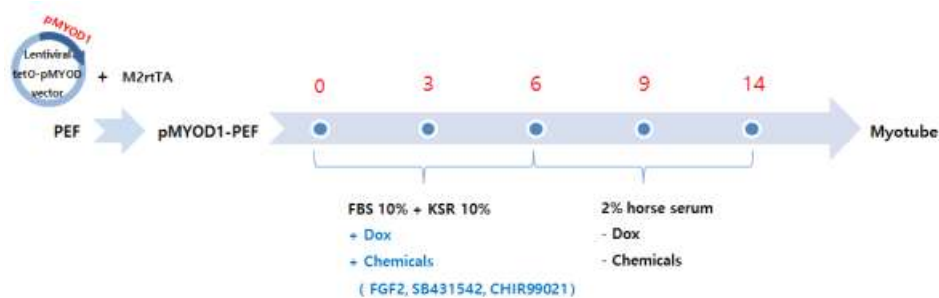


그림 69. MyoD1 과발현을 통한 돼지 섬유아세포주의 근육 분화 유도 모드도

- MyoD1을 태아 섬유아세포에서 과발현 시킨 결과, 14일 간 배양 동안 세포의 형태학적인 특징은 크게 변하지 않았음. 예상한 결과와 달리 근육으로의 분화가 진행되지 않았음(그림 70)

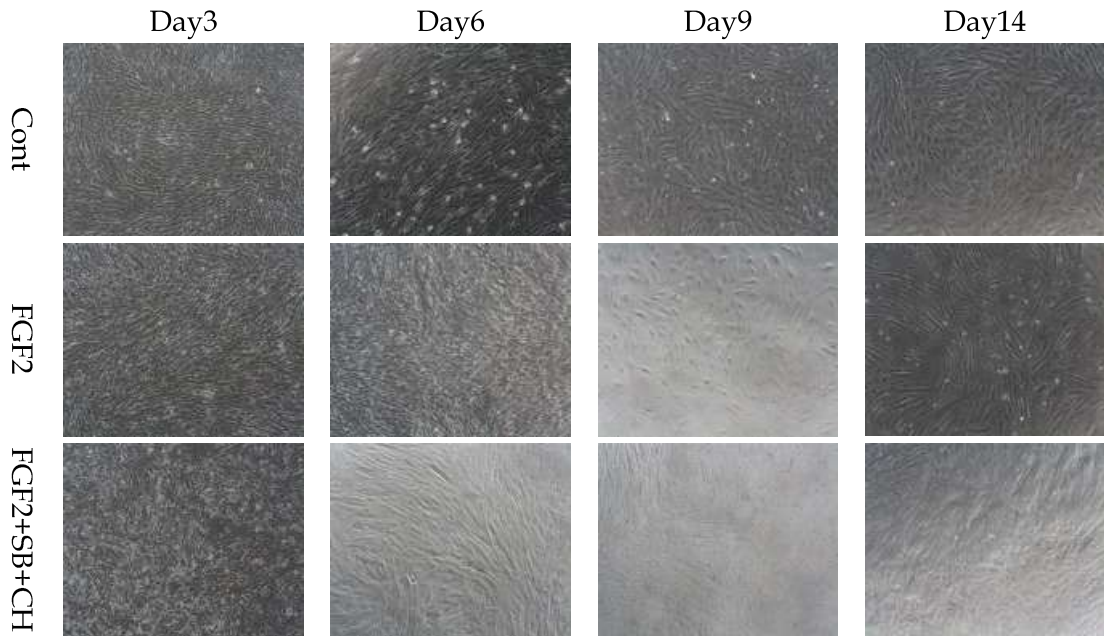


그림 70. MyoD1이 과발현된 돼지 섬유아세포주의 성장 모습

- 유전자 발현을 확인한 결과, FGF2, SB431542, CHIR99021을 처리한 배양 조건에서 근육 분화에 관련된 유전자인 MyoD1, Myf5, MyoG의 발현이 증가하는 것을 확인하였음. 하지만 doxycycline이 제거된 후에 해당 유전자들의 발현이 점진적으로 감소하는 것을 확인함 (그림 71)

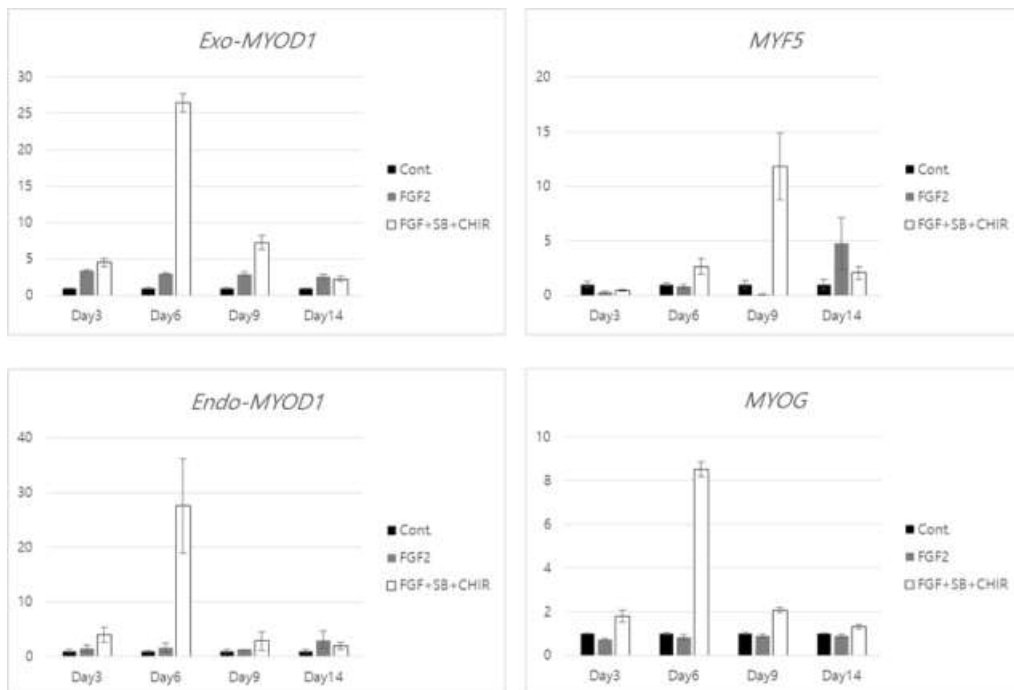


그림 71. MyoD1 과발현을 통한 돼지 섬유아세포주의 유전자 발현 양상 변화

- 결과적으로 MyoD1의 과발현은 6일째 지속이 되었을 때 섬유아세포에서 근육줄기세포 관련 유전자들이 가장 높게 발현하는 것을 확인하여 6일 이후에는 근육분화 배양액으로 바

꾸어 근섬유 형성을 확인하였음. 그 결과, 8일 이후부터 근섬유가 관찰되었으며 근섬유 관련 유전자들의 발현이 증가한 것을 확인하였음. 또한 미오신중쇄 염색결과를 통해 형성된 근섬유가 근절을 구성하고 있음을 보여주었음

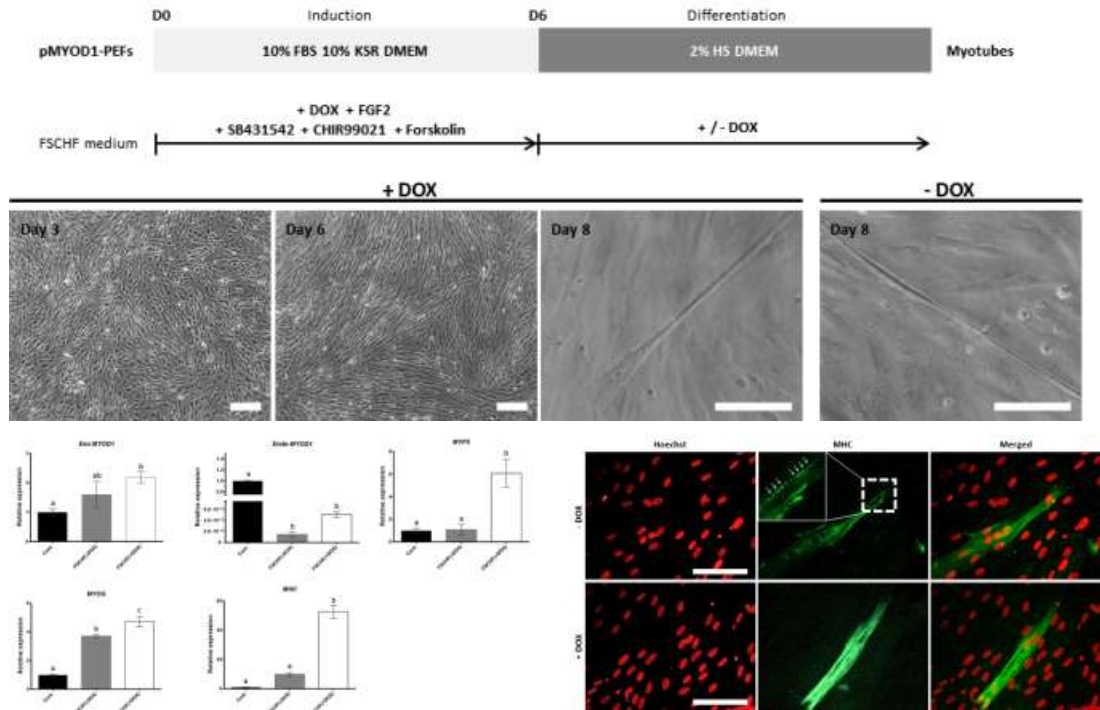


그림 72. MyoD1 과발현을 통한 돼지 섬유아세포주의 유전자 발현 양상 변화

<제2협동연구기관 서울대학교>

[1년차]

○ 등심, 목심, 삼겹살 근섬유 조성 및 지방 분포에 의한 품질 특성 분석

- 등심, 목심, 삼겹살의 일반성분 및 이화학적 특성

표 7. 돈육 등심, 목심, 삼겹살의 일반성분 및 물리화학적 특성

	등심	목심	삼겹살	SEM ¹
조단백질(%)	21.72 ^a	16.27 ^b	14.09 ^c	0.276
조지방(%)	6.61 ^c	19.21 ^b	33.13 ^a	1.013
수분(%)	71.77 ^a	63.52 ^b	50.74 ^c	1.116
보수력(%)	64.01 ^a	62.30 ^a	49.36 ^b	2.244
pH	5.65 ^c	6.15 ^a	5.96 ^b	0.037
가열감량(%)	28.77	29.53	27.80	0.831

¹Standard errors of the means(n=36).

^{a-c}Different letters within the same row differ significantly($P < 0.05$).

- 등심, 목심, 삼겹살의 일반성분 결과에 따라 조단백질과 수분은 등심, 목심, 삼겹살 순으로 유의적으로 높았으며(표 7), 조지방은 이와 반대로 삼겹살에서 가장 높은 것으로 나타남. 이에 따라 등심, 목심, 삼겹살의 기본 품질 특성에 차이가 나타나는 것으로 사료됨. 보수력은 삼겹살에 비하여 등심과 목심에서 유의적으로 높았으나, 가열감량은 유의적인 차이가 없었음. pH의 경우 목심, 삼겹살, 등심 순으로 유의적으로 높았음

- 등심, 목심, 삼겹살의 조직감

표 8. 돈육 등심, 목심, 삼겹살의 조직감

	등심	목심	삼겹살	SEM ¹
Hardness	176.17 ^a	94.55 ^b	56.46 ^c	7.344
Springiness	0.70	0.80	0.80	0.050
Chewiness	64.70 ^a	38.55 ^b	19.27 ^c	3.802
Cohesiveness	0.54 ^a	0.52 ^a	0.43 ^b	0.024

¹Standard errors of the means(n=36).

^{a-c}Different letters within the same row differ significantly($P < 0.05$).

- 각 부위의 기본적인 품질 특성의 차이가 식감에 어떤 영향을 주는지 확인하고자 등심, 목심, 삼겹살을 패티 형태로 제조하여 조직감을 분석하였음(표 8). Hardness와 chewiness는 등심, 목심, 삼겹살 순으로 유의적으로 감소하는 것으로 나타남. Springiness는 부위간 차이가 나타나지 않았고, cohesiveness는 등심과 목심간의 차이는 없었으나 삼겹살은 나머지 두 부위에 비하여 유의적으로 낮은 값을 보였음

- 등심, 목심, 삼겹살의 패티 관능평가

표 9. 돈육 등심, 목심, 삼겹살의 패티 관능 묘사분석

	등심	목심	삼겹살	SEM ¹
풍미	3.71 ^b	4.86 ^a	4.81 ^a	0.072
씹힘성	2.77 ^c	4.94 ^b	5.86 ^a	0.080
다즙성	2.88 ^c	4.92 ^b	5.79 ^a	0.063

¹Standard errors of the means(n=36).

^{a-c}Different letters within the same row differ significantly($P < 0.05$).

- 기계적 분석과 더불어 관능평가를 통해 소비자의 입에서 인식되는 차이를 확인하였음(표 9, 10). 등심, 목심, 삼겹살로 제조한 패티에서 느껴지는 풍미의 강도는 삼겹살과 목심이 등심에 비하여 유의적으로 높았음(표 9). 씹힘성과 다즙성은 삼겹살, 목심, 등심 순으로 높았음. 패티의 외관 및 씹힘성의 기호도는 목심이 가장 높은 반면, 등심은 가장 낮았음(표 10). 씹힘성의 기호도는 씹힘성의 강도와 정비례 하지는 않았음. 풍미의 기호성의 경우 목심, 삼겹살이 등심보다 높았으며, 풍미 강도가 강할수록 기호성이 높았음. 또한 삼겹살이 목심보다 다즙한 것으로 평가되었으나 기호도에서는 유의적인 차이가 없었으며, 등심은 다즙성이 가장 낮고 기호도 또한 가장 낮은 것으로 나타남. 종합적 기호도는 목심, 삼겹살, 등심 순으로 높게 평가되었으며, 이는 외관 및 씹힘성의 기호도와 유사한 경향을 보였음

표 10. 돈육 등심, 목심, 삼겹살의 패티 관능 기호도 평가

	등심	목심	삼겹살	SEM ¹
외관 기호도	2.71 ^c	5.88 ^a	4.54 ^b	0.055
풍미 기호도	3.77 ^b	5.17 ^a	5.02 ^a	0.061
씹힘성 기호도	3.56 ^c	5.17 ^a	4.75 ^b	0.086
다즙성 기호도	3.13 ^b	5.02 ^a	5.11 ^a	0.096
종합적 기호도	3.17 ^c	5.31 ^a	4.88 ^b	0.108

¹Standard errors of the means(n=36).

^{a-c}Different letters within the same row differ significantly($P < 0.05$).

- 근섬유 조성 분석

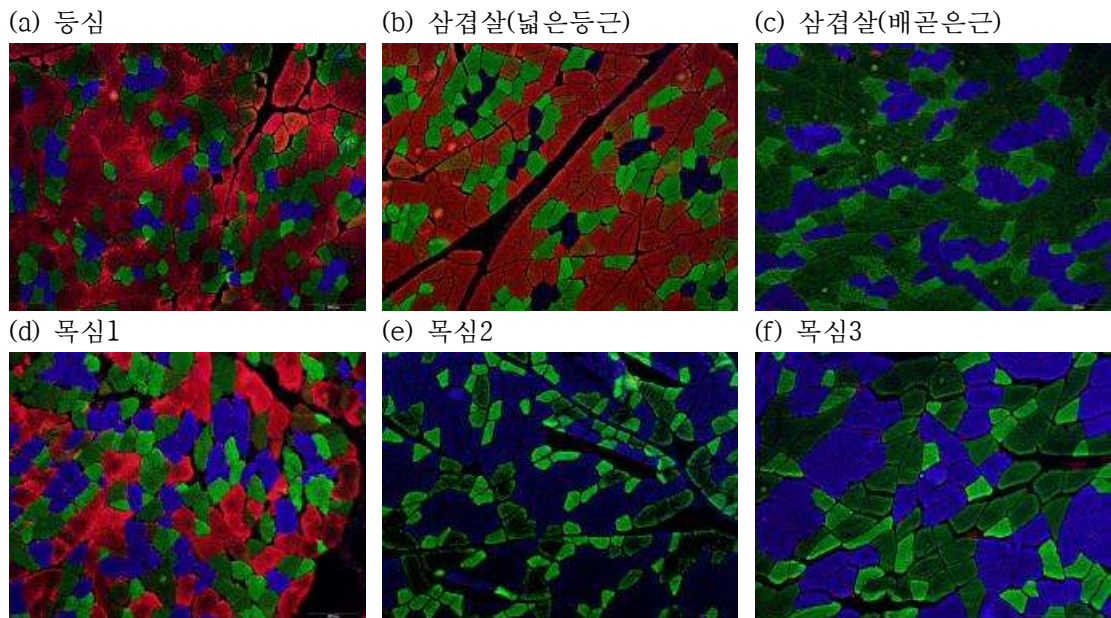


그림 73. 부위별 돈육의 근섬유 조성 분석

· 지방과 더불어 근육을 구성하고 있는 근섬유는 돈육 품질에 영향을 미칠 수 있는 요소 중 하나임. 그에 따라 삼겹살(넓은등근 및 배곧은근), 등심(배최장근), 목심(서로 다른 유형의 3부위 근육)의 근육을 채취하여 근섬유 조성을 분석하였음(그림 73, 표 11). Type I 근섬유의 상대 면적비는 목심, 삼겹살, 등심 순으로 높았으며, type II B 근섬유의 상대 면적비는 반대의 경향을 보였음. Type II A 근섬유의 상대 면적비는 목심과 삼겹살이 같은 비율을 보였으며, 등심이 가장 적은 비율을 보였음. Type II X 근섬유 면적비는 삼겹살, 목심, 등심 순으로 그 비율이 감소하였음. 등심은 type II B, type II X, type I, type II A, 순으로 근섬유 면적비가 감소하였음. 목심은 type I 가 가장 많은 면적을 차지하였으며, 그 다음으로 type II X가 많은 면적비율을 차지하였음. Type II A와 type II B의 경우 비슷한 면적비를 보였음. 삼겹살의 경우 type II X 근섬유가 가장 많았으며, type II A 근섬유가 가장 적은 면적비를 보였으며, type I 과 type II B 근섬유는 비슷한 면적비를 보였음

표 11. 돈육 등심, 목심, 삼겹살의 근섬유 유형별 상대 면적비(%)

	등심	목심	삼겹살	SEM ¹
Type I	11.16 ^{cy}	40.49 ^{aw}	24.52 ^{bx}	0.830
Type II A	6.41 ^{bz}	13.23 ^{ay}	11.51 ^{ay}	0.768
Type II X	25.58 ^{cx}	35.22 ^{bx}	41.01 ^{aw}	1.261
Type II B	56.85 ^{aw}	11.07 ^{cy}	22.97 ^{bx}	1.542
SEM ²	1.224	1.127	1.080	

¹Standard errors of the means(n=36).

²Standard errors of the means(n=48).

^{a-c}Different letters within the same row differ significantly($P<0.05$).

^{w-y}Different letters within the same column differ significantly($P<0.05$).

- 돈육 등심, 목심, 삼겹살의 근섬유 조성 및 품질간 상관관계 분석
 - 부위별 근섬유 조성의 차이를 확인한 후 돈육의 품질요소와 근섬유 유형간의 상관관계를 확인하였음(표 12-14). 등심의 경우 type I 근섬유의 상대 면적비는 pH, 조단백, 조지방 함량과는 음의 상관관계를, 수분, 풍미강도, 씹힘성 묘사와는 양의 상관관계를 갖는 것으로 나타남(표 12). Type II A 근섬유의 상대 면적비는 조단백과 음의 상관관계를, 씹힘성과는 양의 상관관계를 갖는 것으로 나타남. Type II X 근섬유 상대 면적비는 조단백, 조지방과 음의 상관관계를, 가열감량, 수분, chewiness, 외관 기호도, 씹힘성 강도와 양의 상관관계를 갖는 것으로 나타남
 - 목심은 type I 근섬유의 상대 면적비는 chewiness, 다즙성과 음의 상관관계를 보였으며, type II A 근섬유의 상대 면적비는 hardness와 음의 상관관계, pH, springiness, 풍미 강도와 양의 상관관계를 보임(표 13). Type II X 근섬유의 상대 면적비는 pH, springiness, 풍미 강도와 양의 상관관계, 수분 hardness와는 양의 상관관계를 갖는 것으로 나타남. Type II B의 상대 면적비는 수분, 조단백, hardness, 씹힘성 강도, 종합적 기호도와 음의 상관관계를, pH, 조지방, cohesiveness, 풍미 강도와 양의 상관관계를 갖는 것으로 나타남
 - 삼겹살은 type I 근섬유의 상대 면적비와 pH, cohesiveness가 양의 상관관계를 갖는 것으로 나타남(표 14). Type II A 근섬유의 상대 면적비의 경우 springiness, chewiness와 외관 기호도, 풍미 강도, 종합적 기호도는 음의 상관관계를 가진 반면, 수분과는 양의 상관관계를 나타냄. Type II X의 상대 면적비는 chewiness, cohesiveness, 씹힘성 및 다즙성 강도와 음의 상관관계, 가열감량, 조지방과는 양의 상관관계를 보였음. Type II B의 상대 면적비는 보수력, chewiness, 외관 기호도, 풍미, 다즙성 강도, 종합적 기호도와 양의 상관관계를 보였음

표 12. 근섬유 유형별 상대 면적비(%)와 등심의 품질 특성 상관계수(r^2)

등심	근섬유 유형별 상대 면적비(%)			
	Type I	Type II A	Type II X	Type II B
pH	-0.88 ^{***}	-0.54	-0.44	0.74 ^{**}
가열감량	0.41	0.44	0.77 ^{**}	-0.56
보수력	0.17	-0.36	-0.06	0.04
수분	0.75 ^{**}	0.41	0.87 ^{***}	-0.76 ^{**}
조단백질	-0.70 [*]	-0.84 ^{***}	-0.85 ^{***}	0.86 ^{***}
조지방	-0.71 ^{**}	0.29	-0.85 ^{***}	0.70
Hardness	0.39	0.19	-0.30	-0.17
Springiness	-0.17	-0.18	0.55	-0.01
Chewiness	0.10	-0.24	0.65 [*]	-0.16
Cohesiveness	-0.09	-0.38	0.46	0.03
외관 기호도	0.18	-0.25	0.66 [*]	-0.21
풍미 강도	0.80 ^{**}	0.36	0.30	-0.61 [*]
씹힘성 강도	0.87 ^{**}	0.86 ^{***}	0.90 ^{***}	-0.97 ^{***}
다즙성 강도	0.28	0.27	-0.45	-0.10
종합적 기호도	0.48	0.32	-0.24	-0.28

^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$

표 13. 근섬유 유형별 상대 면적비(%)와 목심의 품질 특성 상관계수(r^2)

목심	근섬유 유형별 상대 면적비(%)			
	Type I	Type II A	Type II X	Type II B
pH	0.53	0.69 [*]	-0.82 ^{**}	0.78 ^{***}
가열감량	-0.03	-0.16	-0.12	0.33
보수력	0.39	0.19	0.12	-0.52
수분	-0.21	-0.53	0.73 ^{**}	-0.88 ^{***}
조단백질	0.35	-0.14	0.35	-0.72 ^{**}
조지방	-0.29	0.17	-0.44	0.82 ^{**}
Hardness	-0.46	-0.78 ^{**}	0.93 ^{***}	-0.96 ^{***}
Springiness	0.14	0.70 [*]	-0.80 ^{**}	0.93 ^{***}
Chewiness	-0.81 ^{**}	-0.31	0.27	0.11
Cohesiveness	-0.37	0.11	-0.36	0.76 ^{**}
외관 기호도	0.19	-0.42	0.35	-0.46
풍미 강도	0.45	0.88 ^{***}	-0.77 ^{**}	0.61 [*]
씹힘성 강도	-0.16	-0.20	0.49	-0.66 [*]
다즙성 강도	-0.74 ^{**}	-0.45	0.57	-0.37
종합적 기호도	-0.24	-0.18	0.45	-0.58 [*]

^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$

표 14. 근섬유 유형별 상대 면적비(%)와 삼겹살의 품질 특성 상관계수(r^2)

삼겹살	근섬유 유형별 상대 면적비(%)			
	Type I	Type II A	Type II X	Type II B
pH	0.74**	-0.16	-0.97***	0.38
가열감량	-0.36	-0.24	0.89***	-0.27
보수력	-0.24	-0.16	-0.56	0.67*
수분	-0.04	0.74**	-0.22	-0.34
조단백질	-0.26	-0.11	-0.36	0.50
조지방	-0.40	-0.35	0.81**	-0.11
Hardness	-0.26	0.06	-0.52	0.51
Springiness	0.45	-0.78**	-0.24	0.46
Chewiness	0.44	-0.66*	-0.75**	0.75**
Cohesiveness	0.75**	-0.36	-0.58*	0.23
외관 기호도	-0.10	-1.00**	-0.12	0.86***
풍미 강도	0.00	-0.80**	-0.55	0.97***
씹힘성 강도	0.48	0.36	-0.89***	0.11
다즙성 강도	0.40	-0.27	-0.94***	0.65*
종합적 기호도	-0.46	-0.94***	0.21	0.79**

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

표 15. 선행 질문

질문	Response options	Consumers	
		number	%
돼지고기를 구입할 때 중요하게 생각하시는 특징은 무엇입니까?	냄새	27	12.8
	육색	77	36.5
	지방량	34	16.1
	가격	73	34.6
돼지고기 소비지 어떤 형태의 부위를 선호하십니까?	지방이 많은 부위	29	13.7
	살코기가 많은 부위	134	63.5
	상관없다.	48	22.7
선호하는 부위는 무엇입니까?	삼겹살	110	52.1
	등심	19	9.0
	목심	58	27.5
	앞다리	20	9.5
	뒷다리	2	0.9
	기타	2	0.9
성별	남성	104	49.3
	여성	107	50.7
연령	20대	43	20.4
	30대	41	19.4
	40대	43	20.4
	50대	43	20.4
	60세 이상	41	19.4
돼지고기를 선호하십니까?	예	193	91.5
	아니오	18	8.5
돼지고기를 직접 구입해보신 경험이 있습니까?	예	208	98.6
	아니오	3	1.4

- 돈육 등심, 목심, 삼겹살의 외관 특성에 따른 소비자의 외관 품질 인식 차이 조사
- 관능평가 결과에서 외관 특성은 소비자에게 중요한 돈육 품질 요소였음. 그에 따라 대상으로 한 설문조사를 통해 배양돈육이 고려해야할 외관 품질 요소를 확인하고자 하였음.

선정된 샘플 사진에 앞서 선행 질문을 통하여 소비자들의 특성은 표 15와 같았음

- 소비자들은 돼지고기를 구입할 때 육색을 가장 중요시하였으며, 다음으로 가격, 지방량, 냄새를 중요시하는 것으로 나타남. 따라서 돈육의 외관적 특징에 있어서는 육색이, 그 다음으로 지방량을 고려하는 것으로 알 수 있음. 소비시 선호하는 형태의 경우에는 살코기가 많은 부위를 선호한다고 응답한 반면(63.5%), 가장 선호하는 부위로서는 삼겹살, 목심, 앞다리, 등심 등의 순서로 나타남. 이 결과를 통하여 소비자들이 지방보다는 살코기가 많은 부위를 선호하지만, 삼겹살, 목심과 같은 지방량이 많은 부위를 선호하는 것으로 보아 이는 절대적인 지방량이 아니라 각 부위에서 어느 정도 적절한 지방량을 원하는 것으로 유추할 수 있음
- 외관으로 드러난 지방량과 육색값을 기준으로 선정된 등심, 목심, 삼겹살 부위별 3장의 샘플 사진으로 소비자를 대상으로 외관평가를 실시한 결과 각 샘플이 다른 평가를 받았고, 부위별로 그 정도에도 차이가 있음을 확인함(표 16).

표 16. 제시된 돈육 등심, 목심, 삼겹살의 외관평가

등심	등심 A (6.2%)	등심 B (7.8%)	등심 C (13.0%)	SEM ¹
밝기	4.61 ^b	3.02 ^c	4.98 ^a	0.077
적색도	3.70 ^b	4.80 ^a	3.86 ^b	0.092
육색 기호도	4.76 ^a	3.91 ^b	4.80 ^a	0.081
지방량	4.04 ^b	2.96 ^c	4.50 ^a	0.087
지방량 기호도	4.59 ^a	4.14 ^b	4.60 ^a	0.083
지방 분포	4.21	4.06	4.25	0.089
지방 분포 기호도	4.56	4.29	4.48	0.082
종합적 기호도	4.78 ^a	4.16 ^b	4.66 ^a	0.079
목심	목심 A (19.6%)	목심 B (26.4%)	목심 C (23.5%)	SEM ¹
밝기	4.27 ^a	3.61 ^b	4.41 ^a	0.083
적색도	4.43 ^b	4.72 ^a	4.34 ^b	0.076
육색 기호도	4.64 ^a	4.14 ^b	4.65 ^a	0.077
지방량	4.71 ^a	4.46 ^b	4.70 ^a	0.070
지방량 기호도	4.41	4.42	4.40	0.080
지방 분포	4.26 ^b	4.42 ^{ab}	4.55 ^a	0.080
지방 분포 기호도	4.39	4.45	4.50	0.079
종합적 기호도	4.49	4.32	4.55	0.082
삼겹살	삼겹살 A (37.9%)	삼겹살 B (46.9%)	삼겹살 C (56.1%)	SEM ¹
밝기	3.79 ^c	4.25 ^b	4.58 ^a	0.077
적색도	4.71 ^a	4.42 ^b	4.00 ^c	0.074
육색 기호도	4.54 ^a	4.61 ^a	3.89 ^b	0.080
지방량	4.54 ^b	4.59 ^b	5.59 ^a	0.079
지방량 기호도	4.55 ^a	4.60 ^a	3.15 ^b	0.094
지방 분포	4.66 ^a	4.53 ^a	3.01 ^b	0.095
지방 분포 기호도	4.66 ^a	4.56 ^a	3.04 ^b	0.095
종합적 기호도	4.78 ^a	4.74 ^a	3.21 ^b	0.095

¹Standard errors of the means(n=633).

^{a-c}Values with different letters within the same row indicate significant difference($P < 0.05$).

· 상기 결과를 바탕으로 각 부위의 외관 특성과 소비자들의 실제 인식 수준에 어떠한 차이가 있는지 알아보고자 상관분석을 실시하였음(표 17-19). 등심의 경우 육색의 밝기는 육색의 기호도와 양의 상관관계를 보인 반면, 적색도는 소비자의 육색 기호도에 영향을 미치지 않는 것으로 나타남. 등심 지방량이 많고 지방이 고르게 분포할수록 해당 지표에 대한 소비자의 만족도는 증가하는 것으로 나타남. 등심의 외관의 종합적 기호도는 육색, 지방량, 지방 분포정도가 긍정적으로 영향을 끼치는 것으로 나타남. 목심의 경우 육색 기호도는 밝기와 적색도 모두와 양의 상관관계를 갖는 것으로 나타났으며, 지방량과 지방 분포정도 역시 이들의 기호도와 양의 상관관계를 보였음. 목심의 외관 종합적 기호도는 육색의 밝기, 적색도, 지방량, 지방 분포 정도와 모두 양의 상관관계를 갖는 것으로 나타남. 삼겹살은 육색 기호도는 밝을수록, 붉은빛을 덜수록 높아지는 것으로 나타났으며, 지방량의 경우 음의 상관관계를 보였음. 이는 지방이 많은 부위인 삼겹살의 경우에도 지방이 너무 많을 경우 오히려 소비자들이 부정적 인식을 보일 수 있음을 나타냄. 지방 분포정도는 다른 두 부위와 마찬가지로 고르게 퍼질수록 소비자의 기호도가 증가하는 경향을 보였음. 삼겹살의 종합적 기호도는 밝기, 적색도, 지방 분포도와는 양의 상관관계를, 지방량과는 음의 상관관계를 갖는 것으로 나타남

표 17. 등심 외관품질 요소간 상관관계

등심	묘사			기호도			종합적 기호도	
	적색도	지방량	지방분포	육색	지방량	지방분포		
묘사	밝기	-0.12**	0.55***	0.23***	0.54***	0.30***	0.30***	0.37***
	적색도	1	-0.01	0.18***	-0.01	0.05	0.12**	0.01
	지방량		1	0.33***	0.43***	0.28***	0.22***	0.26***
	지방분포			1	0.35***	0.45***	0.53***	0.46***
기호도	육색				1	0.44***	0.45***	0.53***
	지방량					1	0.67***	0.66***
	지방분포						1	0.75***

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

표 18. 목심 외관품질 요소간 상관관계

목심	묘사			기호도			종합적 기호도	
	적색도	지방량	지방분포	육색	지방량	지방분포		
묘사	밝기	0.05	0.23***	0.32***	0.56***	0.40***	0.36***	0.45***
	적색도	1	0.31***	0.22***	0.18***	0.25***	0.23***	0.15***
	지방량		1	0.27***	0.39***	0.21***	0.20***	0.30***
	지방분포			1	0.39***	0.51***	0.64***	0.52***
기호도	육색				1	0.42***	0.42***	0.58***
	지방량					1	0.71***	0.69***
	지방분포						1	0.70***

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

표 19. 삼겹살 외관품질 요소간 상관관계

삼겹살	묘사			기호도			종합적	
	적색도	지방량	지방분포	육색	지방량	지방분포	기호도	
묘사	밝기	0.12**	0.26***	0.08	0.34***	0.11**	0.09*	0.15***
	적색도	1	0.08	0.43***	0.41***	0.41***	0.41***	0.39***
	지방량		1	-0.27***	-0.01	-0.26***	-0.30***	-0.25***
	지방분포			1	0.54***	0.76***	0.81***	0.79***
기호도	육색			1	0.54***	0.55***	0.57***	
	지방량				1	0.83***	0.81***	
	지방분포					1	0.88***	

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

[2년차]

○ 품종과 성별 조건에 의한 근육위성세포 분화 특성 분석

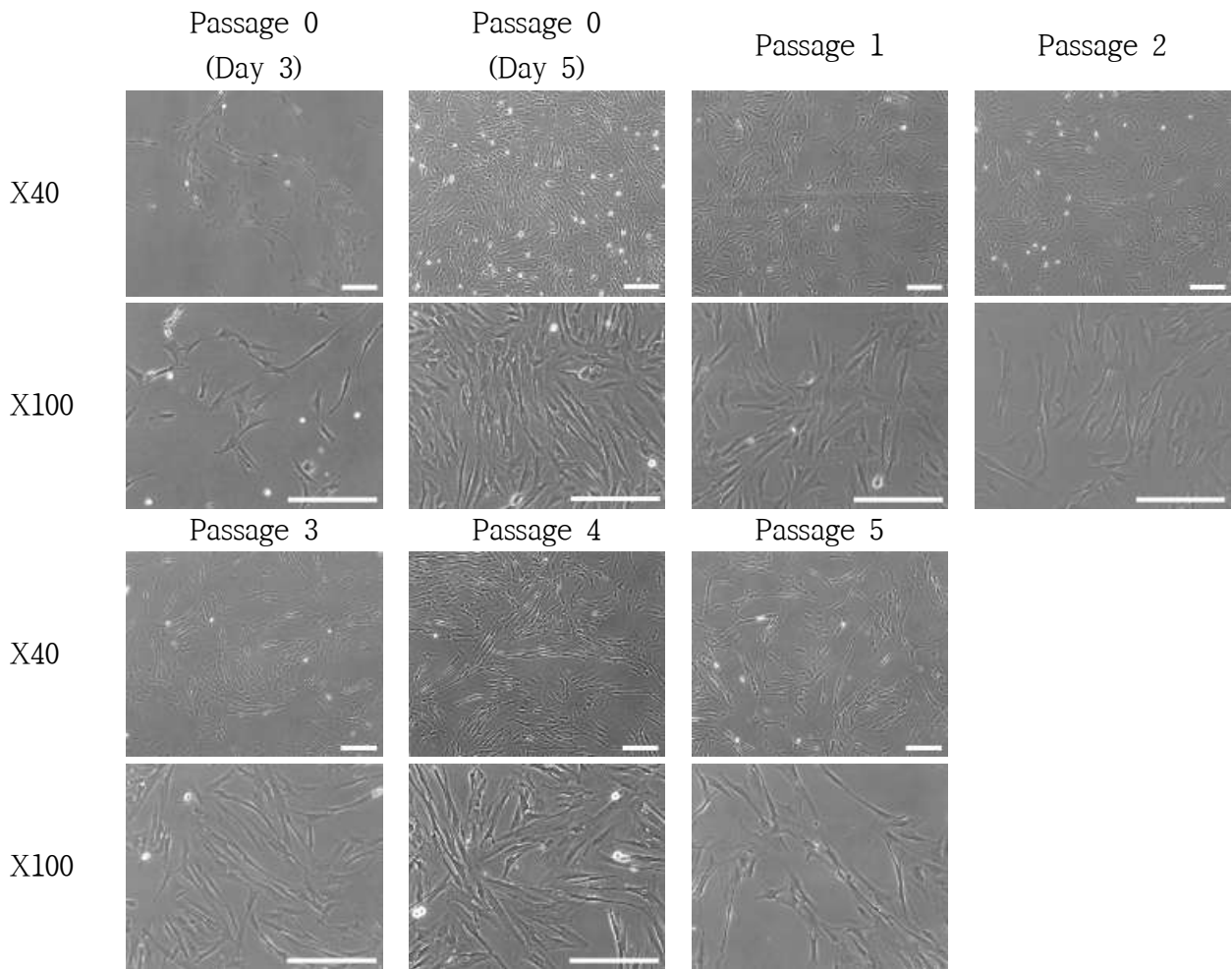


그림 74. 3일령 자돈의 근육위성세포 배양

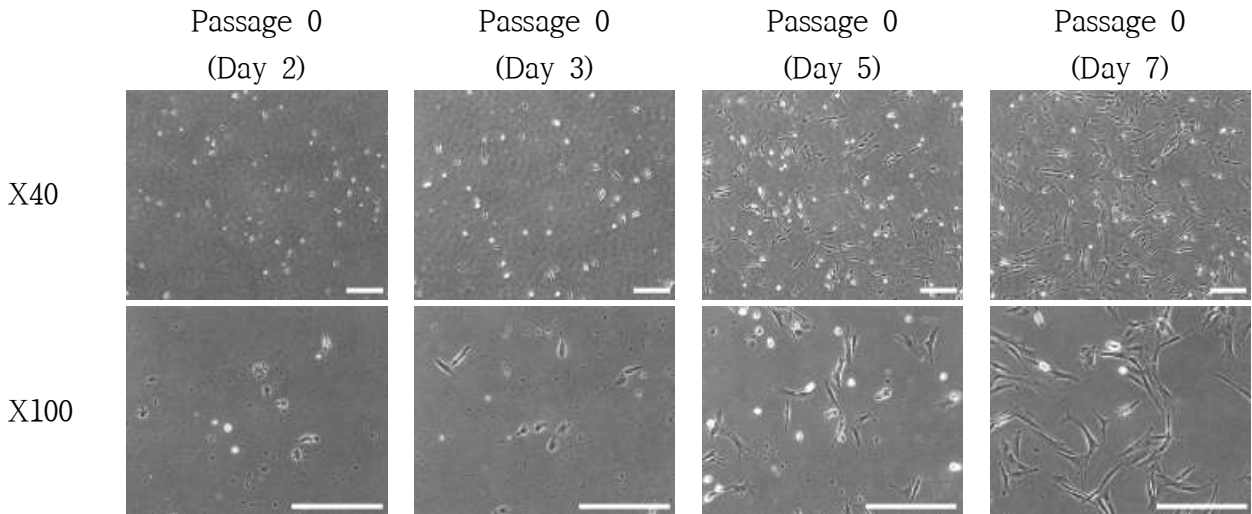


그림 75. 25일령 자돈의 근육위성세포 배양

- 3일령 자돈과 25일령 자돈에서 채취한 세포를 배양하였을 때, 3일령에 비해 25일령 자돈에서 채취한 초기 세포 수가 적은 것을 확인하였음. 또한 일령이 증가함에 따라 배양 시 세포 성장 및 증식이 느려지는 것을 확인하였음. 이에 따라 채취되는 근육 수율과 배양 시 세포 성장을 고려하여 14일령의 동물을 사용하는 것으로 결정하였음(그림 74, 75). 또한 일령에 관계없이 채취 및 동결한 세포의 배양에 있어 계대가 진행될수록 세포 성장 및 증식이 느려지는 경향을 보였으며, 세포 형태가 일정치 못한 것을 발견하였음

- 계대 회차별 근육위성세포 특이적 mRNA 발현 양상 비교

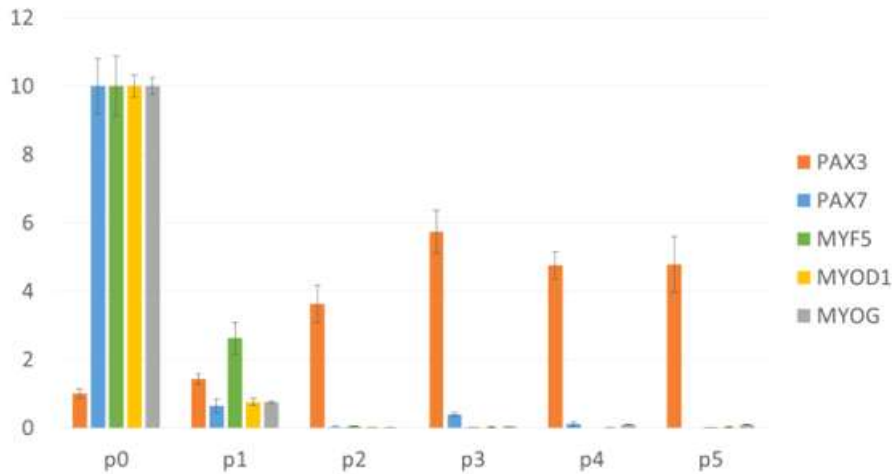


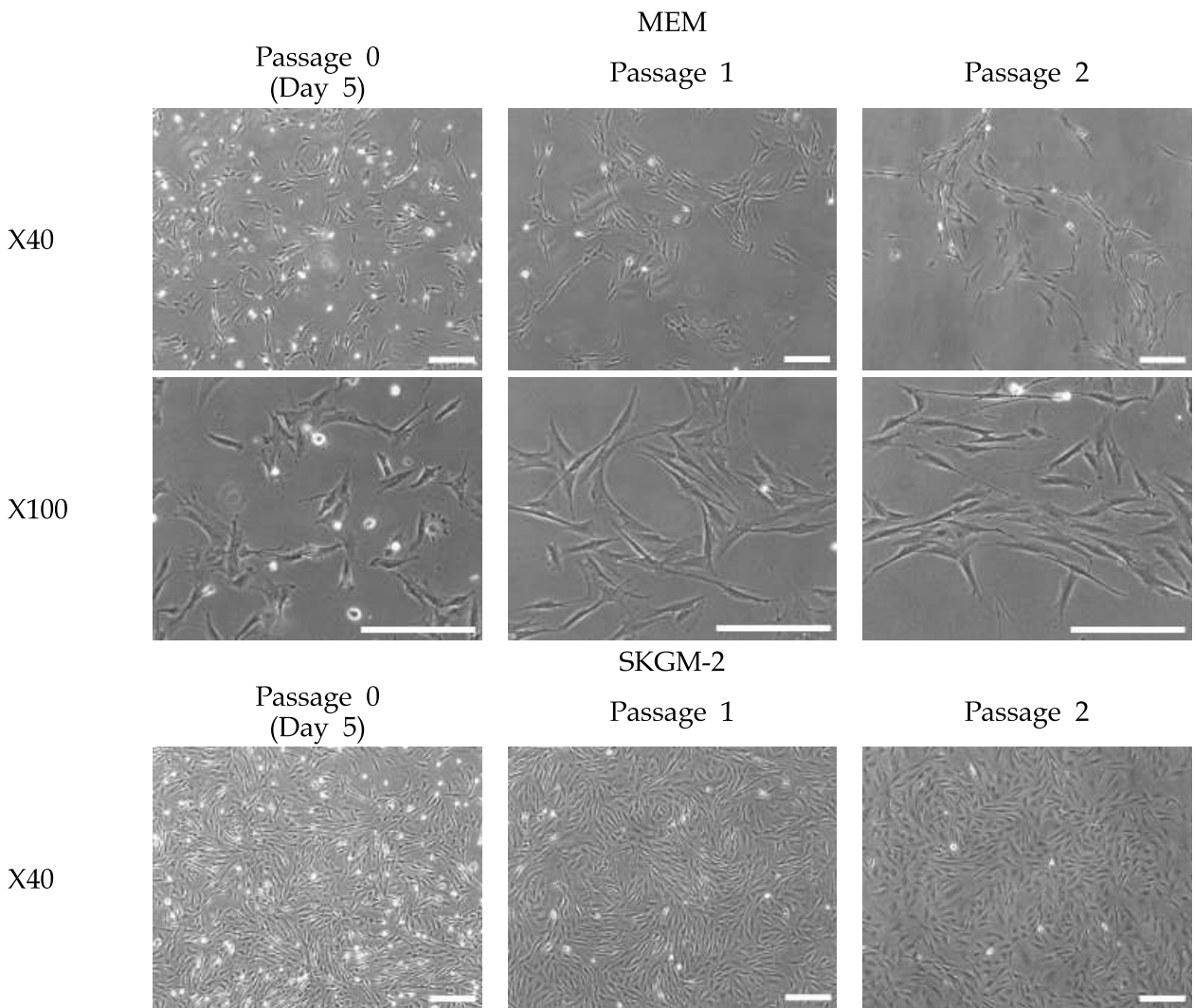
그림 76. 계대배양 회차별 mRNA 발현 양상

- 계대배양 진행 시 세포 성장 및 증식 둔화와 형태 변화는 채취한 근육위성세포의 증식능 및 분화능의 유지와 연관되어 있어 관련 mRNA의 발현량을 통해 세포의 상태를 확인하였음(그림 76). 계대배양의 회차가 진행될수록 PAX3를 제외한 관련 marker gene의 발현량이 현저히 감소하는 것을 확인하였으며, 근육위성세포의 특성이 사용되고 있는 배양 조건에서 유지되지 못한다고 사료됨. 이에 따라 근육위성세포 및 근아세포의 특성을 유

지시될 수 있는 배양 조건을 탐색하고자 하였음

- 기초 배양액에 따른 근육위성세포 특성 비교

- SKGM-2 배양액의 경우 근육위성세포나 근아세포의 배양 시 특성 유지에 도움을 준다고 보고되어 있음. 3일령 자돈의 세포를 기존에 사용하던 MEM과 SKGM-2 배양액에서 각각 배양하였을 때 SKGM-2 배양액에서의 세포 증식률이 MEM에서보다 빨라짐을 확인할 수 있었으며 계대배양 이후에도 이러한 경향이 계속 유지되었음(그림 77)
- 또한, MEM과 SKGM-2 배양액에서의 계대 회차별 관련 유전자 발현 양상을 확인하였을 때 SKGM-2에서 배양한 세포의 발현 mRNA의 감소폭이 MEM에서 보다 줄어들었음(그림 78). 이를 볼 때 SKGM-2 배양액이 기존보다 나은 배양 조건을 유지시켜주는 것으로 판단됨. 그러나 여전히 DNA 발현량이 감소하는 폭이 큰 편이므로 이를 줄일 수 있는 배양 조건의 확립이 필요함



X100

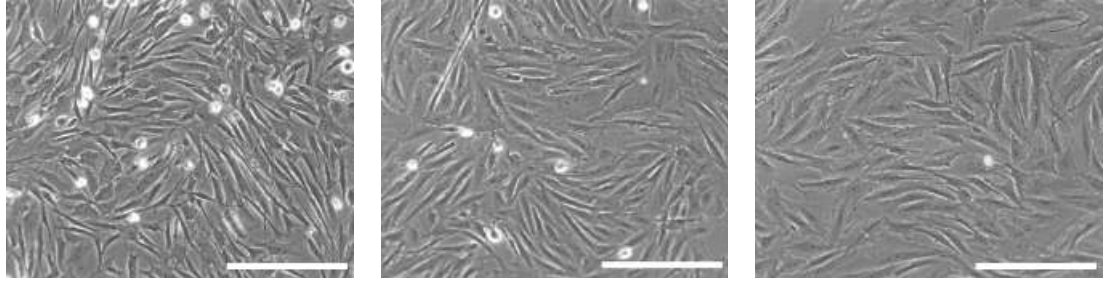
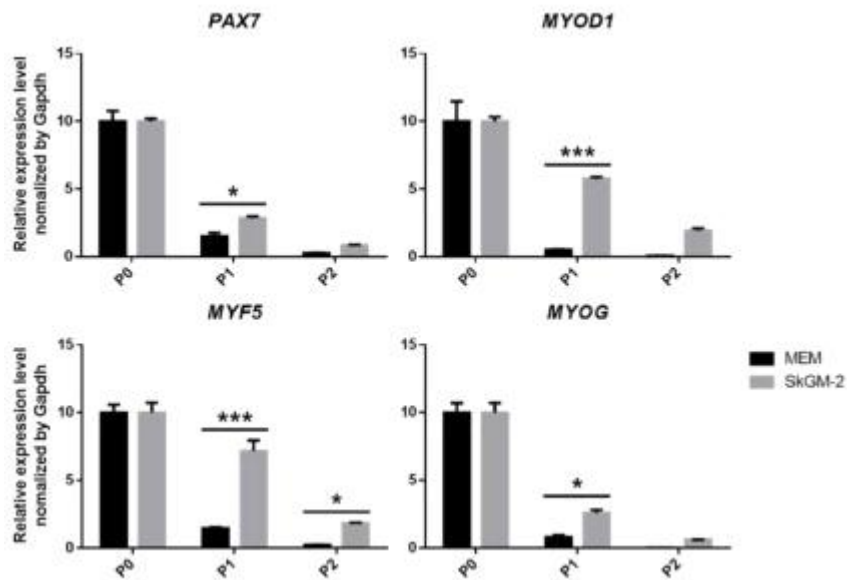


그림 77. MEM과 SkGM-2 배양액 비교

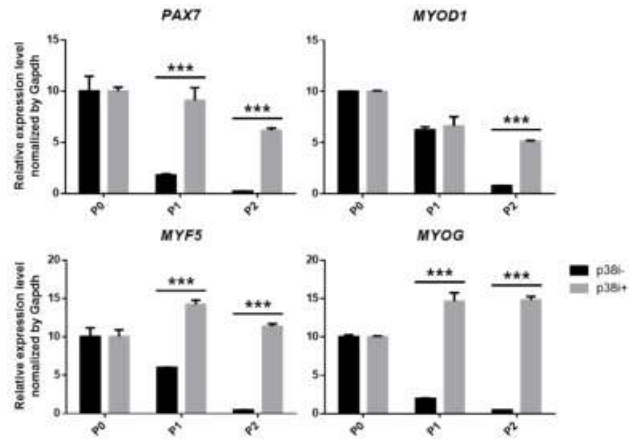
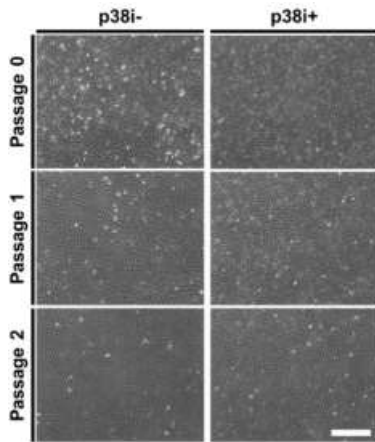


Choi 등, 2020a

그림 78. MEM과 SkGM-2 배양액에 따른 근육위성세포 특이 marker 발현 양상

- p38 inhibitor 처리에 따른 근육위성세포 줄기세포능 유지 능력 향상 확인

- 근육 분화에 관여하는 pathway 가운데 하나인 p38 MAPK pathway의 억제자인 p38i(SB203580)을 처리하여 근육위성세포의 줄기세포능 유지에 기여하는지 확인하였음(그림 79). 그 결과 대조군에 비하여 p38i를 처리하였을 때 passage가 증가함에도 증식능을 유지하는 것을 확인하였으며, 근육위성세포 특이적 marker 역시 p38i를 처리하였을 때 유의적으로 높게 발현함을 확인하였음
- 상기 결과에 따라 돼지 근육위성세포의 배양에는 SKGM-2 배양액과 p38i 처리가 효과적임을 확인하였고, 추후 실험에 해당 배양액과 억제제를 이용하였음



Choi 등, 2020a

그림 79. p38i(SB203580) 처리에 따른 근육위성세포 특성 분석

- MACS를 이용한 근육위성세포의 분리 방법 정립

- 근육조직은 근육세포 이외에 혈관이나 신경, 상피 및 결합조직 같은 다른 여러 세포와 인접한 상태이기 때문에 세포 채취 후 근육위성세포의 분리가 필수적으로 필요함. 본 연구에서는 단시간에 고순도 분리가 가능한 세포분리방법으로서 기존에 널리 사용되고 있는 자기활성세포 분리방법(Magnetic activated cell sorting; MACS)을 활용하였음. 근육위성세포의 세포질에서 특이적으로 발현하는 CD56, CD29를 활용한 양성선택적 분리와 섬유아세포의 세포질에서 특이적으로 발현하는 CD90을 활용한 음성선택적 분리 모두를 시험하여 가장 효율적인 방법을 확인하고자 하였음(그림 80-82)

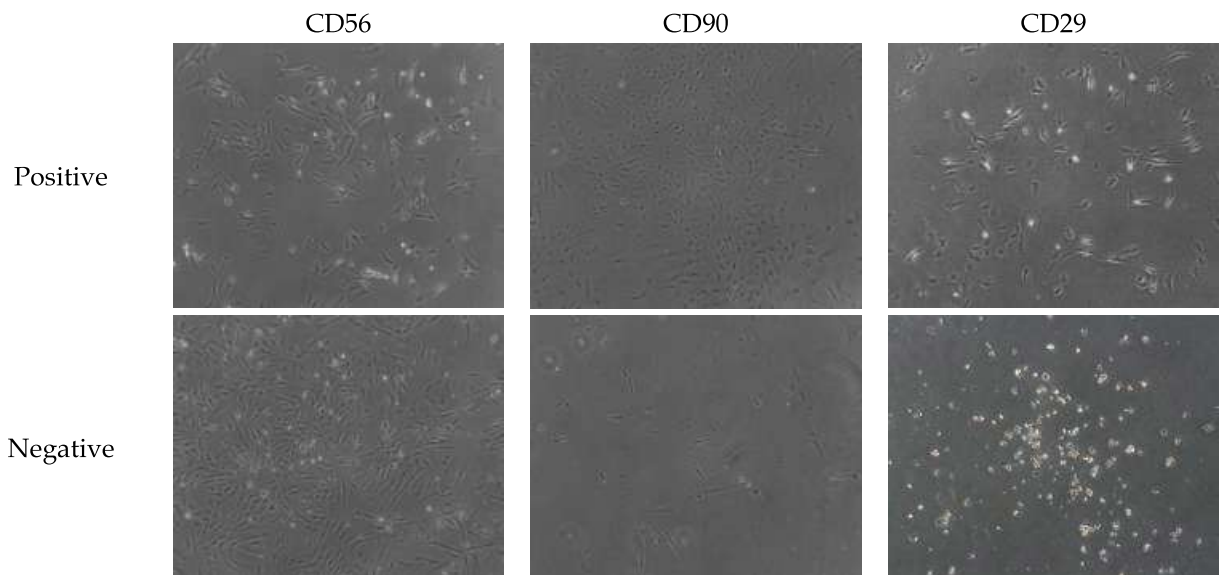


그림 80. MACS 처리 후 분리된 세포의 배양

PAX7

MYOD1

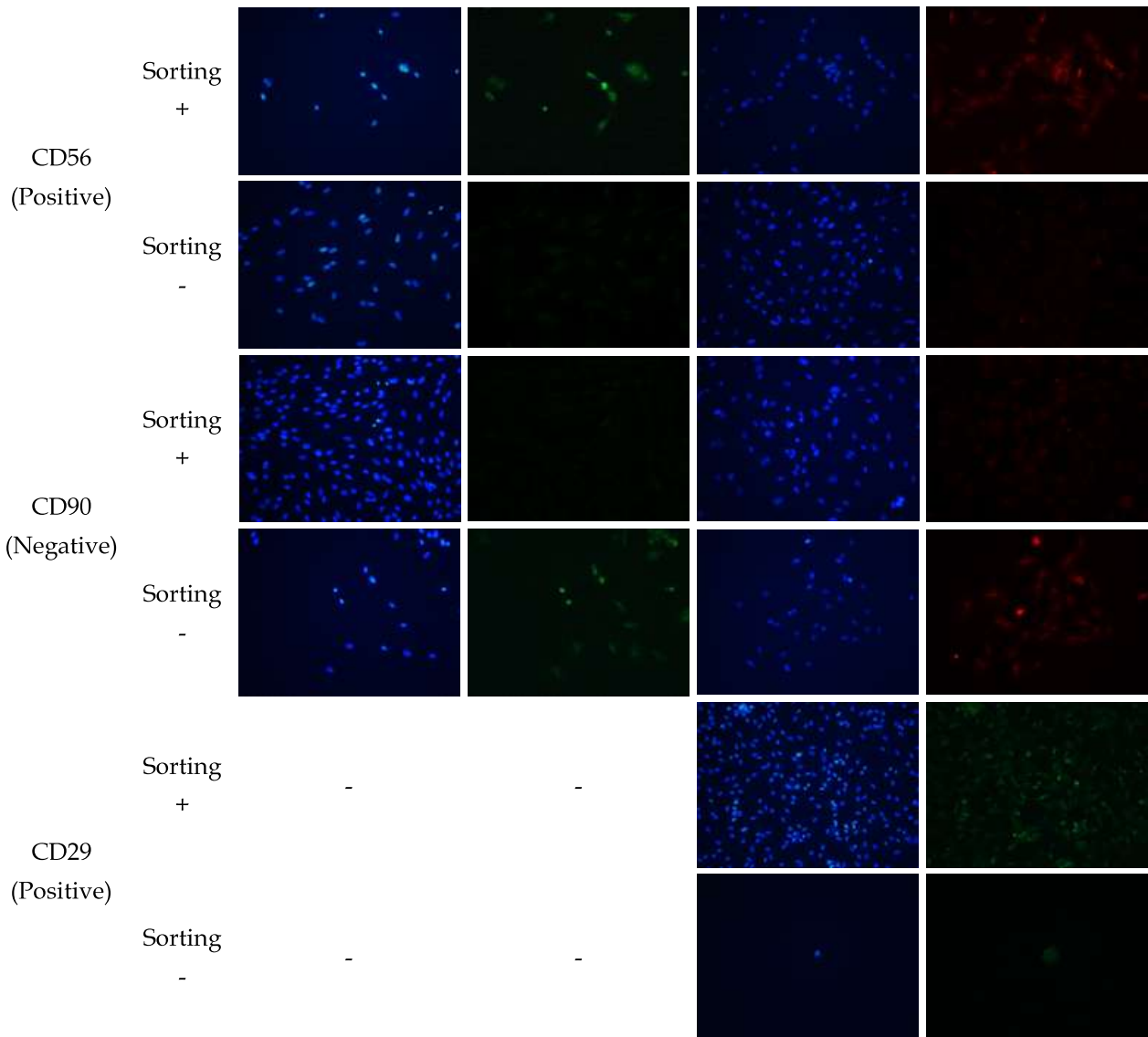
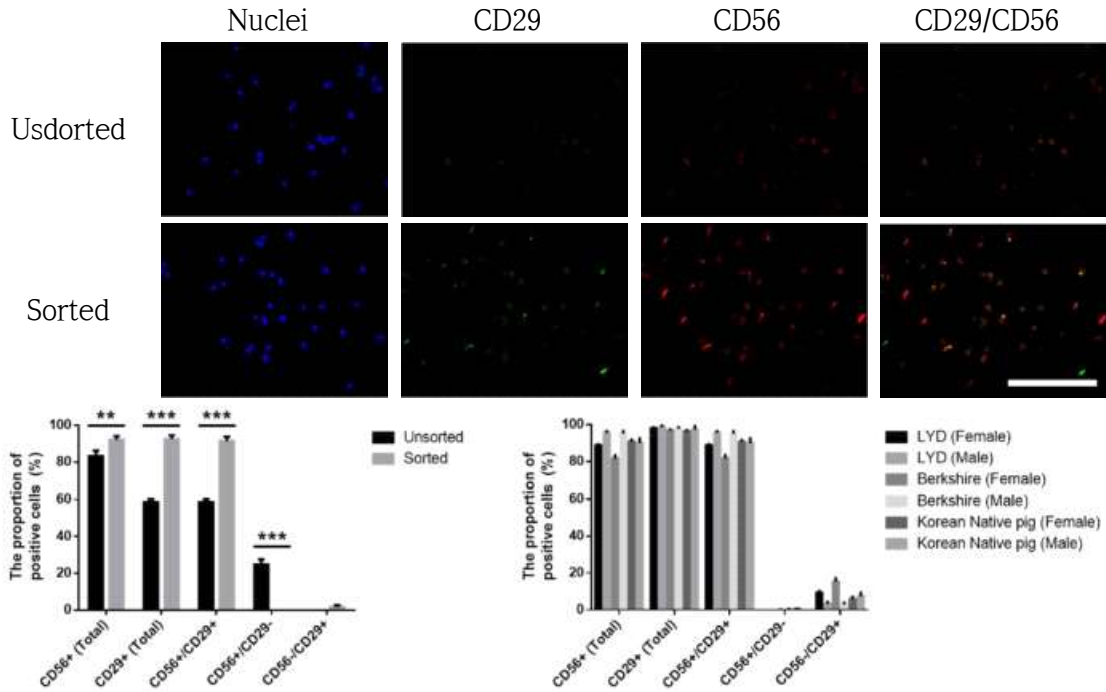


그림 81. MACS방법을 활용한 근육위성세포의 분리

- CD56 항체와 반응한 세포만을 분리한 경우와 CD90 항체와 반응하지 않은 세포만을 분리한 경우 분리된 세포의 수가 많지 않았으며(그림 82), *PAX7*과 *MYOD1* 단백질의 발현이 나타나는 세포가 선택되지 않은 세포(CD56 음성, CD90 양성)에도 일정 수준 존재하는 것을 확인하였음(그림 81). 반면, CD29를 활용하였을 때는 분리되는 세포의 수율이 더 높았으며, 해당 세포에서 *MYOD1* 단백질의 발현도가 다른 분리 방법에 비해 높음을 확인하였음(그림 82).
- 기존의 연구문헌에 의하면 CD56의 발현을 이용한 유세포분석(Fluorescence activated cell sorting; FACS)은 근육위성세포의 분리에 자주 사용되었으나 본 연구에서는 CD56에 의한 분리 효율이 낮았음. 그에 따라 MACS 방법에 의해 발생하는 차이를 확인 및 보완하기 위해 CD29를 병용하여 근육위성세포를 분리한 후 CD56과 CD29의 발현을 형광이미지를 통하여 확인하였음(그림 82). CD29 항체를 이용할 때 세포 분리 수율이 증가하였음. 또한 형광 이미지를 통해 CD56과 CD29의 발현을 확인하였을 때는 CD56의 발현율이 대조군에

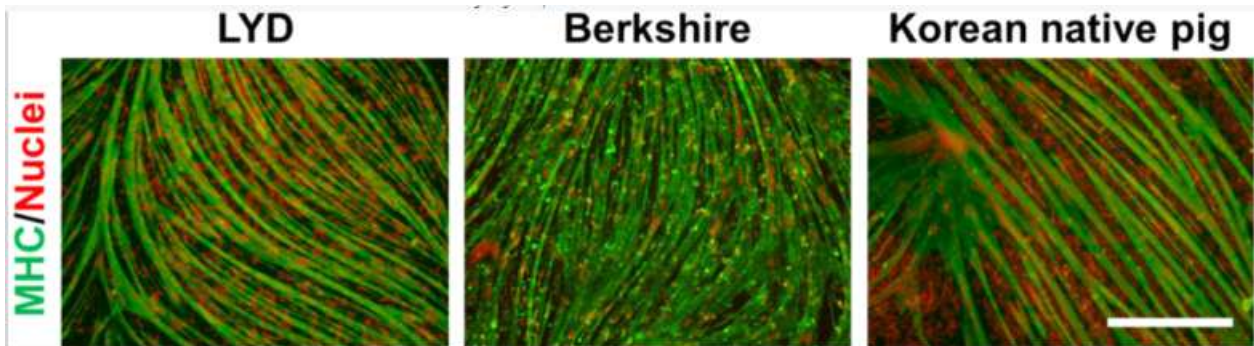
비하여 높게 나타났으며, CD29와 CD56 동시 발현 비율이 85% 수준으로 나타났음. 이는 MACS 방법에서 사용되는 항체의 세포 노출 시간(10-15분)이 형광염색(10시간 이상)에 비해 굉장히 짧기 때문에 발생하는 차이로 확인되며, 높은 분화율을 보이고 있어(그림 82) 근육위성세포의 분리에 문제없이 활용될 수 있을 것으로 사료됨. 해당 연구결과를 바탕으로 정립한 근육위성세포 분리방법 이후 연구에 활용하였음



Choi 등, 2020b

그림 82. CD29 항체와 MACS를 이용한 근육위성세포 분리 후 특성 및 순도

[3년차]



Choi 등, 2020b

그림 83. CD29 항체와 MACS를 이용한 근육줄기세포 분리 후 분화능 확인

- 품종별 근육위성세포 초기 수율 및 성장률

- 품종 및 성별 요인은 돼지의 성장 차이를 발생시키는 요인 중 하나이며, 배양돈육 또한 유래한 동물의 유전적 특성에서 영향을 받을 수 있다고 판단되어 삼원교잡종(LYD), 버크셔(Berkshire), 한국재래돼지(Korean Native)의 암/수컷에서 근육위성세포를 분리하여 수율과 성장률을 확인하여 배양돈육 생산에 적합한 품종 및 성별을 확인하고자 하였음(그림 84, 85)
- 근육위성세포의 초기 수율의 경우 수컷의 경우 품종간의 차이가 크지 않았으나 암컷의 경우 삼원교잡종, 버크셔, 한국재래돼지 순으로 높게 나타났음. 또한 품종에 관계없이 수컷에 비해 암컷의 초기 세포 수율이 높게 나타났음(그림 84). 초기 세포 수를 산출한 후 같은 세포 농도로 맞춘 후 증식 배양을 시작하였음

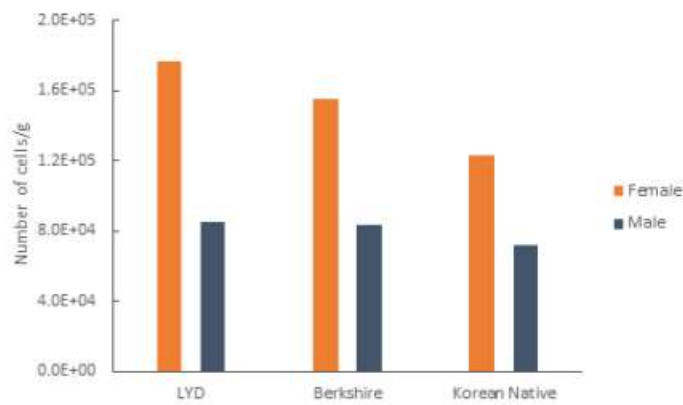
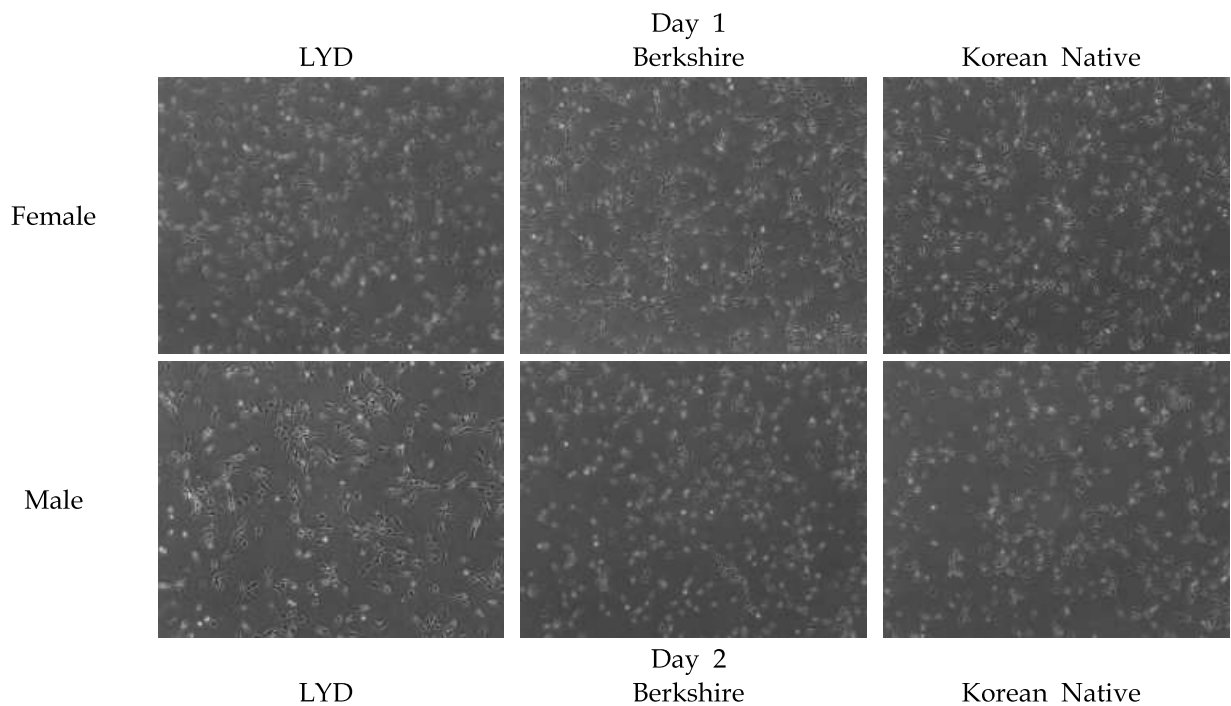


그림 84. 품종 및 성별 근육위성세포 초기 수율



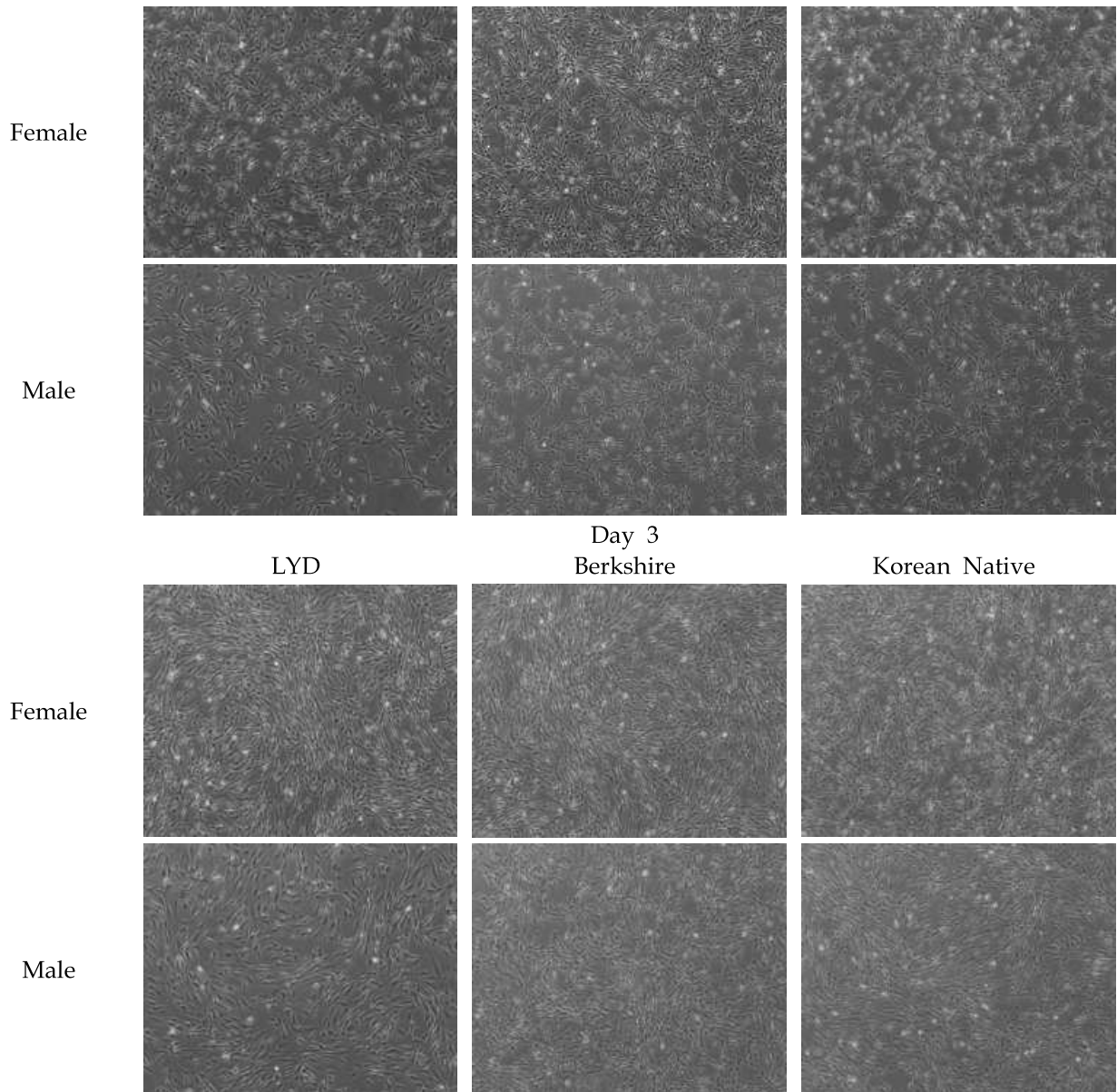


그림 85. 근육위성세포의 증식배양

- 상기의 MACS 방법을 통하여 근육줄기세포를 분리한 결과 근육위성세포의 비율 차이는 있었으나, 근육위성세포의 분리 후 3일간의 증식을 관찰하고 배가시간을 계산한 결과, 품종 및 설병간 유의적인 차이는 없었음(그림 85)
- MHC 단백질 발현량을 통하여 분석한 분화능의 경우 두 성별의 버크셔가 다른 품종에 비하여 유의적으로 높은 값을 나타내었음

○ 세포 유래별 분화된 근섬유의 유형 및 특성 분석

- 세포면역화학법을 통한 근섬유 유형 확인

- 근육조직에서의 근섬유 아형에 의한 유형 확인의 경우 세포면역화학법을 활용하여 진행된 기존의 연구 사례가 다수 존재하나, 본 연구에서 세포에 해당 방법을 활용하여 적용하였

을 때는 한 개의 섬유에 여러 유형의 근섬유 아형 단백질이 공존하는 것으로 나타났으며 이에 따라 체외에서 분화된 근섬유의 유형을 세포면역화학법을 이용하여 분석하는 것은 적절치 않은 것으로 판단함

○ In vitro 배양육 안전성 평가

- 증식 근육줄기세포 염색체 이상 평가

- 본 연구에서의 배양 방법이 돼지 근육위성세포의 염색체적 변화를 유발하지 않고, 식품으로서 안전하게 섭취될 수 있을지를 판단하기 위하여 염색체 이상 평가를 진행하였음(그림 86). 두 번 계대배양을 하고, 증식 4일차인 돼지 근육줄기세포를 핵형 분석을 진행한 결과 염색체 이상이 발견되지 않았음. 따라서, 우리의 실험 방법이 증식 중인 세포에 유해한 영향을 주지 않는 것으로 사료됨. 다만, 실제 섭취 시 문제가 발생하지 않는지를 확인하기 위하여서는 보다 더 다양한 실험이 필요할 것으로 사료됨
- 배아줄기세포의 경우 빠르게 증식하는 특징으로 인한 염색체 이상이 발견될 확률이 근육줄기세포에 비해 높음. 따라서 배아줄기세포를 이용하여 배양육을 생산하기 위해서는 근육줄기세포로 분화 후 주기적인 염색체 검사 및 관리가 필요할 것으로 사료됨

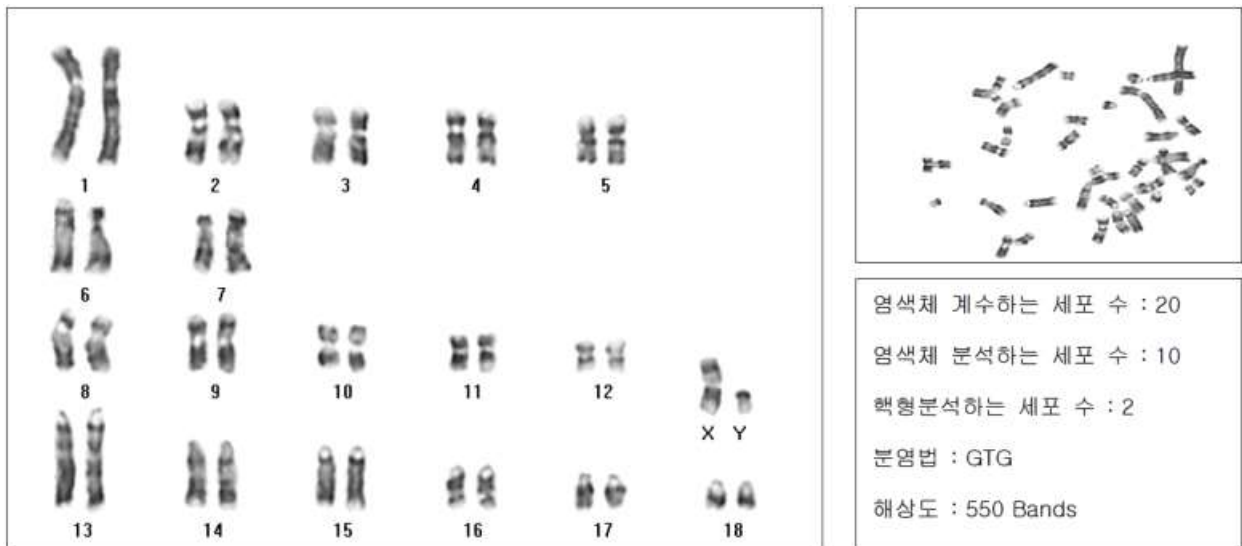


그림 86. 체외배양 근육위성세포의 핵형분석 결과

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

○ 최종목표

- 고부가 식품소재 개발을 위한 세포 배양기술 활용 배양돈육 생산 및 산업화 기반기술 확립

○ 세부목표

<주관연구기관 (주)진바이오텍>

- 돼지 근육위성세포 및 지방전구세포 추출 및 배양기법 확립
- 돼지 근육위성세포 및 지방전구세포의 성장 및 분화 조건 확립
- 조직별 세포의 기능적/구조적 특성 분석
- 근육과 지방세포의 동시배양 기법 확립
- 배양돈육 생산 최적화를 위한 세포배양액 최적화
- 근육위성세포기반 배양돈육 시제품 개발

<제1협동연구기관 서울대학교>

- 돼지 배아줄기세포주를 이용한 근육/지방 세포 분화
- 중간엽 줄기세포 및 근육 줄기세포 분리 및 분화 유도 기술 확립
- 세포 지지체를 활용한 배양육 생산 및 특성 분석

<제2협동연구기관 서울대학교>

- 배양돈육 모델 조사 및 품종별/조건별 근육위성세포 분화 특성 분석
- 세포 유래 유형별 근섬유 특성 분석
- 배양돈육의 특성, 안전성 및 품질 평가

3-2. 목표 달성여부

연 차	세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	달성도 (%)	달성 내용
1차년도 (2018)	○ 근육세포 배양기술 확립	100	- 자돈의 뒷다리 근육 중 Biceps femoris를 통해 조직에서의 근육위성 세포 및 지방전구세포 분리 기법 확립 및 최적화를 진행했으며, 근육 위 성 세포의 배양 조건 확립함
	○ 돼지 배아줄기세포주를 이용한 근육/지방 세포 분화	100	- 기형중 형성능을 가지고 있는 돼지 배아줄기세포의 확립 및 배양에 성공 하였고 이로부터 다양한 세포로의 유 도분화능을 확인함

			<ul style="list-style-type: none"> - 돼지 배아줄기세포로부터 근육으로의 분화기법을 최적화함
	○ 배양돈육 모델 조사 및 조건별 근육위성세포 분화 특성 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> - 등심, 목심, 삼겹살의 물리화학적 특성과 근섬유 유형이 다름을 확인하였으며, 각 부위의 색과 지방 함량에 따라 소비자들의 선호도를 확인하여 소비자들이 원하는 배양돈육 모델을 확립함 - 품종 및 성별에 따른 증식 및 분화 특성을 비교 분석하였으며, 추가적으로 배양액 조성 및 근육줄기세포 순도를 높이기 위한 분리 방법을 확립함
2차년도 (2019)	○ 배양육 생산을 위한 기초공정 확립	100	<ul style="list-style-type: none"> - 근육위성세포와 지방 전구세포 배양 조건을 확립했고 Microcarrier와 Spinner Flask Batch, 그리고 Bioreactor를 이용한 3D 세포 배양 조건 확립함
	○ 중간엽 줄기세포 및 근육 줄기세포 분리 및 분화 유도 기술 확립	100	<ul style="list-style-type: none"> - 돼지 대퇴근에서 추출한 근육 줄기세포의 장기간 배양 기법을 확립함 - 돼지 대퇴근에서 순수한 근육 줄기세포를 분리하는 기법을 개발함 - 돼지 근육줄기세포의 2, 3차원 분화 기법을 개발함
	○ 세포 유래 유형별 근섬유 특성 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> - qPCR법을 이용하여 품종 및 성별에 따라 근섬유 유형 관련 mRNA가 다르게 발현하는 것을 확인함
3차년도 (2020)	○ 배양육 시제품 생산 및 최적화	100	<ul style="list-style-type: none"> - 3D 세포 대량배양에 필요한 지지체 중 식용이 가능한 대체 소재를 선정하여 세포 배양에 적용될 수 있도록 최적화 진행함. 또한 주령에 따른 근육세포의 성장률과 분화율, 그리고 그와 관련한 유전자와 고기의 품질과 연관된 유전자를 선정하여 이 또한 비교 분석 진행함
	○ 세포 지지체를 활용한 배양육 생산 및 특성 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> - 하이드로겔을 이용한 근육줄기세포의 3차원 배양 및 분화를 통한 근육 오가노이드 형성에 성공하였으며 근육오가노이드의 운동성 및 근섬유 형성을 확인함 - 유전자 발현 분석을 통해 분화된 근조직의 근섬유 유형 분석을 실시함
	○ 배양돈육의 안전성 및 품질 평가	100	<ul style="list-style-type: none"> - 식약처 미래식품 사전안전관리 연구용역을 별도로 의뢰받아 세포배양육의 상업화 대비 안전성 평가 기반연구 (2019.06 ~ 2019.12)를 수행하여 식약처 인허가 준비를 마침 - 본 연구팀의 배양조건이 돼지 근육줄기세포의 염색체 이상을 야기하지 않

			<p>는 것을 확인함</p> <ul style="list-style-type: none"> - 2D 배양조건에서 분화된 근섬유의 myosin heavy chain 유형이 주로 Type1인 것을 확인하였음. 추후 대량 생산된 배양육의 품질 특성과 연관 가능
최 중	○ 고부가 식품소재 개발을 위한 세포 배양기술 활용 배양돈육 생산 및 산업화 기반기술 확립	100	<ul style="list-style-type: none"> - 고부가 식품소재 개발을 위한 세포 배양기술 활용 배양돈육 생산 및 산업화 기반기술을 확립함

3-3. 목표 미달성 시 원인 (사유) 및 차후대책 (후속연구의 필요성 등)

- 해당 없음

4. 연구결과의 활용 계획 등

4-1. 연구개발 결과의 활용방안

- 고부가 식품소재 이용 신 산업분야 선도
 - 근육위성세포 및 줄기세포 유래 배양육 시장의 개척
 - 배양육을 이용한 환자식, 노인식 전용 배양육 제품 개발
 - 근육세포와 지방세포의 공동배양 기법을 통한 대체육 구현 식품소재 개발
- 미래원천기술의 확보
 - 다양한 carrier와 세포를 혼합한 3D 세포배양 기술 확보
 - 배양돈육 기술을 활용한 타 축종 배양육 제품 개발 기반 마련
 - 안전성이 보장되고 생리기능성이 부여된 미래식품 개발 기술 기반 마련
- 질병 연구 모델의 확보
 - 근육 분화 기술을 통한 근육성 질환 모델 개발 등 생명공학기술로의 활용 확대

4-2. 기대성과 및 파급효과

- 기술적 측면
 - 단백질 요구량 증가에 따른 대안으로 대두되고 있는 대체육은 국외 연구기관에서 독점 개발하고 있는 실정이라 볼 수 있기에 국내 연구진에 의한 배양육 생산 기술의 자주적인 확립은 독립적인 미래원천기술의 확보 및 사용 권리 보장이라는 의미를 가짐
 - 미래 식량 문제에 대응하고 국내의 식량 자급력 향상을 위한 방안으로 배양육 생산 기술을 활용할 수 있음
 - 생명공학을 활용한 고부가 식품소재 생산의 기준을 제시한 선례로서 의미를 가짐.
 - 배양육의 생산과 더불어 근육 분화 기술로 근육성 질환 모델 개발 등 생명공학기술 활용을 확대시킬 수 있음
- 경제적 산업적 측면
 - 새로운 식육 생산 기술의 확보 및 대량 생산을 기반으로 대체육의 국내 수요를 충족하고 수출에 따른 새로운 이익을 창출할 수 있을 것으로 예상
 - 돼지 만능성 줄기세포의 유도 분화 기술은 첨단연구수행능력 증대, 지적·산업재산권 확보, 고급기술인력 육성, 고부가가치 생명공학기술 개발 활성화 등 국가의 신 성장동력으로 발전 가능하며 새로운 산업에서 국제적으로 유리한 고지를 선점 가능토록 함
- 사회적 측면
 - 동물복지 및 환경문제를 고려한 지속 가능한 녹색 축산의 실현 가능성을 재고할 수 있음
 - 소량의 세포를 이용한 배양육 생산은 생산 소요 면적의 획기적인 감소를 통해 축산 이외에 다른 식량의 생산을 위한 농지 제공을 가능케 하며 미래 식량안보 대책으로서 활용 가능함
 - 소비자에게 있어 육류 생산 및 소비에 대한 새로운 패러다임을 제시하며, 식품안전성과 소비자 니즈를 만족시키는 제품의 생산이 가능토록 함

붙임. 참고문헌

<주관연구기관 (주)진바이오텍>

- Yoshida, N & Yoshida, Shosei & Koishi, K & Masuda, K & Nabeshima, Y.-I. (1998). Cell heterogeneity upon myogenic differentiation: Down-regulation of MyoD and Myf-5 generates 'reserve cells'. *Journal of cell science*. 111 (Pt 6). 769-79.
- Peter S. Zammit, Frederic Relaix, Yosuke Nagata, Ana Pérez Ruiz, Charlotte A. Collins, Terence A. Partridge and Jonathan R. Beauchamp. (2006). Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells. *Journal of Cell Science* 119, 1824-1832
- Littlejohn M, Grala T, Sanders K, Walker C, Waghorn G, Macdonald K, Coppieters W, Georges M, Spelman R, Hillerton E, Davis S, Snell R. Genetic variation in PLAG1 associates with early life body weight and peripubertal weight and growth in *Bos taurus*. *Anim Genet*. 2012 Oct;43(5):591-4.
- Kim, Sang-Wook & Lee, Jun-Heon & Kim, Jin-Ho & Won, You-Seog & Kim, Nae-Soo & Kim, Kwan Suk. (2010). Effect of the Fatty Acid Synthase Gene for Beef Quantity Traits in Hanwoo Breeding Stock. *Journal of Animal Science and Technology*. 52. 9-16.
- Wells, L., Edwards, K. A., & Bernstein, S. I. (1996). Myosin heavy chain isoforms regulate muscle function but not myofibril assembly. *The EMBO journal*, 15(17), 4454-4459.
- Lex B. Verdijk, Tim Snijders, Maarten Drost, Tammo Delhaas, Fawzi Kadi & Luc J. C. van Loon. (2014). Satellite cells in human skeletal muscle; from birth to old age. *AGE* 36, 545-557
- Yamakawa H, Kusumoto D, Hashimoto H, Yuasa S. (2020). Stem Cell Aging in Skeletal Muscle Regeneration and Disease. *Int J Mol Sci*. 21(5):1830
- Peter S. Zammit, Frederic Relaix, Yosuke Nagata, Ana Pérez Ruiz, Charlotte A. Collins, Terence A. Partridge, Jonathan R. Beauchamp. (2006). Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells. *Journal of Cell Science* 2006, 119: 1824-1832
- M. Lotfi, M. Nejib and M. Naceur. (2012). *Cell Adhesion to Biomaterials: Concept of Biocompatibility*
- Eibes, G., dos Santos, F., Andrade, P. Z., Boura, J. S., Abecasis, M. M., da Silva, C. L., & Cabral, J. M. (2010). Maximizing the ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells using a microcarrier-based stirred culture system. *Journal of Biotechnology*, 146(4), 194-197
- Xu-Bo Wu, Cheng-Hong Peng, Fang Huang, Jie Kuang, Song-Lin Yu, Ya-Dong Dong, Bao-San Han, Preparation and characterization of chitosan porous microcarriers for hepatocyte culture, *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*, Volume 10, Issue 5, 2011, Pages 509-515, ISSN 1499-3872

<제1협동연구기관 서울대학교>

- Choi KH, Lee DK, Kim SW, Woo SH, Kim DY, Lee CK. Chemically Defined Media Can Maintain Pig Pluripotency Network In Vitro. *Stem Cell Reports*. 2019 Jul 9;13(1):221-234.
- Choi KH, Lee CK. Pig Pluripotent Stem Cells as a Candidate for Biomedical Application. *J Anim Reprod Biotechnol*. 2019 Sep;34(3):139-147.
- Choi KH, Lee DK, Oh JN, Kim SH, Lee M, Kim SW, Lee CK. Transcriptome profiling of pluripotent pig embryonic stem cells originating from uni- and biparental embryos. *BMC Res Notes*. 2020 Mar 11;13(1):144.
- Choi KH, Lee DK, Oh JN, Kim SH, Lee M, Woo SH, Kim DY, Lee CK. Pluripotent pig embryonic stem cell lines originating from in vitro-fertilized and parthenogenetic embryos. *Stem Cell Res*. 2020 Nov 19;49:102093.
- Chal J, Pourquie O. Making muscle: skeletal myogenesis in vivo and in vitro. *Development*. 2017 Jun 15;144(12):2104-2122.
- Friedrichs M, Wirsdorfer F, Flohe SB, Schneider S, Wuelling M, Vortkamp A. BMP signaling balances proliferation and differentiation of muscle satellite cell descendants. *PLoS One*. 2010 Jan 1;5(1):e8523.
- Choi KH, Yoon JW, Kim M, Lee HJ, Jeong J, Ryu M, Jo C, Lee CK. Muscle stem cell isolation and in vitro culture for meat production: A methodological review. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2021 Jan;20(1):429-457.
- Jeong J, Choi KH, Kim SH, Lee DK, Oh JN, Lee M, Lee CK. Myogenic Transdifferentiation of Pig Fibroblasts Using the Porcine MYOD1 Inducible Vector. 2020. DOI: 10.21203/rs.3.rs-102478/v1

<제2협동연구기관 서울대학교>

- AOAC. (2016). *Official Methods of Analysis* AOAC International. 20th ed. AOAC International. Washington DC, USA
- Folch J, Lees M, Stanley GHS. (1957). A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues. *J Biol Chem*. 226(1): 497
- Choi KH, Yoon JW, Kim M, Jeong J, Ryu M, Park S, Lee CK. (2020). Optimization of Culture Conditions for Maintaining Pig Muscle Stem Cells in Vitro. *Food Sci Anim Resour*. 40(4): 659
- Choi KH, Kim M, Yoon JW, Jeong J, Ryu M, Jo C, Lee CK (2020). Purification of Pig Muscle Stem Cells Using Magnetic-Activated Cell Sorting (MACS) Based on the Expression of Cluster of Differentiation 29 (CD29). *Food Sci Anim Resour*. 40(5): 852

<별첨작성 양식>

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 고부가 식품소재 개발을 위한 배양돈육 생산 기반기술 확립				
	(영문) Establishment of technology to produce cultured pork for development of high value-added food materials				
주관연구기관	(주)진바이오텍		주 관 연 구	(소속) (주)진바이오텍	
참 여 기 업	(주)진바이오텍		책 임 자	(성명) 강 정 선	
총연구개발비 (981,000천원)	계	981,000천원	총 연 구 기 간	18.04.30 ~ 20.12.31 (2년9월)	
	정부출연 연구개발비	735,000천원	총 참 여 연 구 원 수	총 인 원	46
	기업부담금	246,000천원		내부인원	43
	연구기관부담금	0		외부인원	3
<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <p>“고부가 식품소재 개발을 위한 세포 배양기술 활용 배양돈육 생산 및 산업화 기반기술 확립”</p> <ul style="list-style-type: none"> - 돼지 근육세포 배양 기술 최적화 및 대량 생산 기반 확보 - 돼지 줄기세포의 근육 및 지방세포 분화 및 배양 기술 개발 - 배양돈육 모델 설정 및 근육세포와 배양돈육의 특성 분석 - 배양돈육 시제품 1건 - 특허출원 3건, 특허등록 1건, 고용창출 2명 - SCI 논문 10편, 비SCI 논문 2편, 학술발표 19건, 인력양성 6명, 홍보전시 5건 <p>○ 연구내용 및 결과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 돼지 줄기세포의 근육 및 지방세포 분화 및 배양 기술 확립 - 돼지 근육세포 배양 기술 확립 - 배양돈육 대량 생산을 위한 기초공정 확립 - 돼지 배아줄기세포 배양 기법 개발 및 특성화 작업 - 돼지 배아줄기세포의 근육유도분화 기법 개발 - 근육 분화에 관여하는 인자 발굴 - MYOD1 과발현을 통한 섬유아세포의 근육교차분화 기법 개발 - 돈육 부위별 소비자 선호 외관 모델 확립 - 품종 및 성별에 따른 근육위성세포 차이 분석 - <i>In vitro</i> 근육위성세포 안전성 확인 및 배양 근섬유 특성 분석 <p>○ 연구성과 활용실적 및 계획</p> <ul style="list-style-type: none"> - 배양육 시장 개척 및 대체육 구현 식품소재 개발 - 배양육을 이용한 유아식, 환자식, 노인식 전용 식품 개발 - 배양돈육 기술을 활용한 타 축종 배양육 제품 개발 - 근육 분화 기술을 통한 근육성 질환 모델 개발 등 생명공학기술 활용 확대 - 미래 단백질 안보 문제에 선제 대응 및 국내 식량 자급력 향상 - 동물복지 및 환경문제를 고려한 지속 가능한 녹색 축산의 실현 가능성을 제고 - 생명공학을 활용한 고부가 식품소재 생산의 기준 제시 - 육류 생산 및 소비에 대한 새로운 패러다임 제시 - 식품안전성과 소비자 니즈를 만족시키는 육제품 생산 가능 					

[별첨 2]

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호		118042-03	
사업구분	고부가가치식품개발사업				
연구분야	식품핵심소재		과제구분	단위	
사업명	고부가가치식품개발사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	고부가 식품소재 개발을 위한 배양돈육 생산 기반기술 확립		과제유형	개발	
연구기관	(주)진바이오텍, 서울대학교, 세종대학교		연구책임자	강 정 선	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	18.04.30~18.12.31	215,000	72,000	287,000
	2차연도	19.01.01~19.12.31	260,000	87,000	347,000
	3차연도	20.01.01~20.12.31	260,000	87,000	347,000
	4차연도				
	5차연도				
	계	18.04.30~20.12.31	735,000	246,000	981,000
참여기업	(주)진바이오텍				
상대국	해당 없음	상대국연구기관	해당 없음		

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2021년 01월 25일

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
(주)진바이오텍	연구소장	강 정 선

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확 약	
-----	---

I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수)

본 연구는 현재 세계적으로 각광받고 있는 배양육에 대한 기초 연구로써 지난 3년간 국내에서 배양육 생산을 위한 기반 기술들을 구축하였음. 또한, 돼지라는 종에 있어서 배아줄기세포의 확립, 근육줄기세포 분리 및 배양 기법 개발 등 세계적으로 선도할 만한 우수한 성과를 도출하였기에 아주우수한 연구개발 결과라고 판단됨.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수)

해당 연구 결과는 동물 복지 및 환경 문제를 고려한 지속 가능한 녹색 축산의 실현가능성을 높이고, 육류 소비에 대한 새로운 패러다임을 제시할 것임. 또한, 가축 줄기세포를 활용한 농생명공학 분야의 연구 활성화 및 지적재산권 확보, 고부가가치 생명공학 기술 개발 활성화 등 국가의 신성장동력으로 발전 가능하고, 새로운 산업에서 국제적으로 유리한 고지를 선점 할 것으로 판단됨.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수)

근육줄기세포 배양을 통한 배양육 생산 기법은 미래원천기술의 확보 및 사용 권리 보장에 있어 매우 중요함. 이를 통해 인구 증가에 의한 식량 안보 문제를 해결이 가능함. 또한 돼지 줄기세포의 근육 분화 기술은 배양육 뿐아니라 근육성 질환 모델 개발등의 의생명공학적 활용이 가능함.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수)

연차별로 설정한 연구목표가 모두 성실하게 수행이 되었고, 실제 배양돈육 시제품 생산으로 이어졌음.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수)

논문 (SCI 및 비SCI)을 비롯해 국·내외 학술 발표 등의 성과에서 총 연구년도의 목표치를 초과하는 성과를 달성했음. 또한, 일부 논문 실적은 연구수행기관에서 우수 연구 성과로 선정되고 해당 분야 상위 1.5%이내 저널에 게재하는 등 다양한 우수한 성과를 도출하였음

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
○ 근육세포 배양기술 확립	10	100	근육세포 배양기술을 확립함
○ 돼지 배아줄기세포주를 이용한 근육/지방 세포 분화	10	100	돼지 배아줄기세포를 이용하여 근육으로의 분화기법을 개발함
○ 배양돈육 모델 조사 및 조건별 근육위성세포 분화 특성 분석	10	100	돈육 부위별 특성을 확인하였으며, 외관에 따른 소비자 선호도를 확인하여 효과적인 배양육 모델을 확립함 품종 및 성별에 따른 근육위성세포 분화 특성을 면역화학염색법, PCR 등 다양한 방법으로 분석함
○ 배양육 생산을 위한 기초공정 확립	10	100	배양육 생산을 위한 기초공정을 확립함
○ 중간엽 줄기세포 및 근육 줄기세포 분리 및 분화 유도 기술 확립	10	100	돼지 대퇴근으로부터 근육줄기세포를 분리하여 분화 기법을 확립함
○ 세포 유래 유형별 근섬유 특성 분석	10	100	품종 및 성별에 따른 근섬유 관련 유전자 발현 양상을 확인하여, 근섬유 특성 차이를 분석함
○ 배양육 시제품 생산 및 최적화	10	100	배양육 시제품을 생산함
○ 세포 지지체를 활용한 배양육 생산 및 특성 분석	10	100	근육의 3차원 배양을 통한 근육 오가노이드 형성을 통해 배양돈육 시제품을 생산함
○ 배양돈육의 안전성 및 품질 평가	10	100	식약처와 함께 배양육 안전성과 관련한 연구를 진행하였을 뿐만 아니라, 배양조건이 세포의 염색체 이상을 야기하지 않는 것을 확인하였으며, 근섬유 유형과 관련한 발현 정량을 실시하여, 생산된 근섬유의 품질적 특성을 확인함
○ 고부가 식품소재 개발을 위한 세포 배양기술 활용 배양돈육 생산 및 산업화 기반기술 확립	10	100	고부가 식품소재 개발을 위한 세포 배양기술 활용 배양돈육 생산 및 산업화 기반기술을 확립함
합계	100점		

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

전세계적인 배양육에 관한 관심에 비하여 국내의 배양육에 대한 관심 및 연구 수준은 매우 미흡한 실정이다. 본 연구는 돼지 근육줄기세포 및 배아줄기세포주를 이용한 배양돈육 연구의 초석을 마련하였다. 돼지의 근육과 지방세포의 추출 및 배양기법을 확립하여 배양돈육 생산 최적화를 위한 세포배양액 최적화 연구를 수행하였고 근육위성세포 기반 배양돈육 시제품을 생산하였다. 기술적 측면에 더하여 식약처와의 협업을 통해 추후 생산될 배양육의 전문적이고 안전한 관리법을 확립하는데 기여하였다. 따라서 고부가 식품소재 개발을 위한 세포 활용 배양돈육 생산 및 산업화 기반 기술을 확립하는데 본 과제의 연구개발결과가 기여할 수 있을 것으로 보인다.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

배양육 관련 국내 연구가 초기 단계임에도 본 연구는 정성 및 정량적 성과를 충분히 달성하여 배양육 연구 및 제도화 기반을 마련한 점을 고려해주시길 부탁드립니다. 배양육 생산을 위한 배지, 세포지지체 및 배양 조건을 확립하였고 면역화학염색법 및 유전자기법 등을 통한 세포 특성을 구명함으로써 향후 다양한 축종의 배양육 생산의 기초 자료를 확보하였다. 돼지 세포를 이용한 배양돈육 시제품 생산은 세계적으로도 첫 번째 사례임으로 본 과제는 국제적인 기술 경쟁력을 제시할 수 있을 것으로 보인다.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

본 연구를 통해 얻은 결과를 바탕으로 배양육 생산 원천 기술을 확보하였고 향후 학회 참여와 논문 발표 등을 통해 연구 교류를 활발히 함과 동시에 산업화 방향을 마련할 예정이다. 또한 배양돈육에 국한한 것이 아닌 여러 축종(배양우육 및 배양계육)의 배양육 제품군으로 확대하여 신식품소재로서의 응용 가치를 모색할 계획이다. 계속된 연구를 통해 단가 절감 및 품질 향상을 실현하여 세계 선도 수준의 배양육 생산 기반을 마련할 수 있도록 할 계획이다.

IV. 보안성 검토

o 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

해당 없음

2. 연구기관 자체의 검토결과

해당 없음

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	식품핵심소재	
연구과제명	고부가 식품소재 개발을 위한 배양돈육 생산 기반기술 확립			
주관연구기관	(주)진바이오텍		주관연구책임자	강 정 선
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	735,000,000	246,000,000	0	981,000,000
연구개발기간	2018.04.30 ~ 2020.12.31			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input checked="" type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
○ 근육세포 배양기술 확립	근육세포 배양기술을 확립함
○ 돼지 배아줄기세포주를 이용한 근육/지방 세포 분화	돼지 배아줄기세포를 이용하여 근육으로의 분화기법을 개발함
○ 배양돈육 모델 조사 및 조건별 근육위성세포 분화 특성 분석	<ul style="list-style-type: none"> - 돼지고기 선호 부위인 등심, 목심, 삼겹살의 이화학적 품질과 근섬유 조성 및 지방 분포와 같은 외관적 특성을 분석하여 소비자들이 선호하는 모델링 작업을 수행하였음. - 품종 및 성별에 따른 근육위성세포 분화 특성을 분석하였으며, 추가적으로 최적 배양액 확립 및 근육위성세포 순도를 높일 수 있는 분리 방법을 확립하였음.
○ 배양육 생산을 위한 기초공정 확립	배양육 생산을 위한 기초공정을 확립함
○ 중간엽 줄기세포 및 근육 줄기세포 분리 및 분화 유도 기술 확립	돼지 대퇴근으로부터 근육줄기세포를 분리하여 분화 기법을 확립함
○ 세포 유래 유형별 근섬유 특성 분석	품종 및 성별에 따른 근섬유 유형과 관련된 mRNA 발현 양상이 다른 것을 확인함
○ 배양육 시제품 생산 및 최적화	배양육 시제품을 생산함
○ 세포 지지체를 활용한 배양육 생산 및 특성 분석	근육의 3차원 배양을 통한 근육 오가노이드 형성을 통해 배양돈육 시제품을 생산함
○ 배양돈육의 안전성 및 품질 평가	In vitro 조건에서 배양된 근육위성세포가 염색체 이상이 없음을 확인함 근육위성세포 기반 배양돈육의 품질 평가를 위하여 PCR 기반 mRNA 발현 양상을 토대로 근섬유 유형을 분석하였으며, 생산된 배양 근섬유의 근섬유 유형이 Type1 위주인 것을 확인함
○ 고부가 식품소재 개발을 위한 세포 배양기술 활용 배양돈육 생산 및 산업화 기반기술 확립	고부가 식품소재 개발을 위한 세포 배양기술 활용 배양돈육 생산 및 산업화 기반기술을 확립함

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특 허 출원	특 허 등록	품 종 등록	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표	정 책 활 용			홍 보 전 시		
												SC I	비 SC I						논 문 평 균 IF	
단위	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	20	25	-	10	5	-	-	-	10	-	-	-	10	10	-	5	-	5	-	
최종목표	3	1	-	1	10	-	-	-	2	-	-	7	2	2	13	-	5	-	4	-
연구기간내 달성실적	3	1	-	2	25	-	-	-	2	-	-	10	2	3.0 07	19	-	6	-	5	-
달성율(%)	10 0	10 0	-	10 0	10 0	-	-	-	10 0	-	-	10 0	10 0	10 0	10 0	-	10 0	-	10 0	-

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	돼지 근위성 세포의 추출 및 배양기법
②	돼지 만능성 줄기세포 배양용 배지 조성물

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복 제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업제이전 (상품화)	현장애로 해 결	정책 자료	기타
①의 기술		V					V			
②의 기술		V				V				

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	근위성 세포의 추출 및 배양기법을 활용하여 배양육 심화 연구 수행
②의 기술	만능성 줄기세포 배양용 배지 조성물을 활용하여 배양육 심화 연구 수행

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용-홍보		기타 (타 연구 활용 등)	
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		논문평균 IF			학술발표	정책활용		홍보전시
												SCI	비SCI							
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명					
가중치	20	25	-	10	5	-	-	-	10	-	-			10	10	-	5	-	5	-
최종목표	3	1	-	1	10	-	-	-	2	-	-	7	2	2	13	-	5	-	4	-
연구기간내 달성실적	3	1	-	2	25	-	-	-	2	-	-	10	2	3.007	19	-	6	-	5	-
연구종료후 성과창출 계획	0	2	-	0	0	-	-	-	0	-	-	0	0	-	0	-	0	-	0	-

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

- 해당 없음

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.