

## 도축되는 한우 혈액에서 회수한 혈청의 생물학적 안전성 분석

김민수<sup>1</sup> · 유지은<sup>1</sup> · 민경호<sup>1</sup> · 김지희<sup>2</sup> · 최인호<sup>2</sup> · 남상섭<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>건국대학교 수의과대학 수의학과, <sup>2</sup>영남대학교 생명공학부

## Assessing Biological Safety of the Hanwoo Serum Obtained During Slaughtering Process

Minsoo Kim<sup>1</sup>, Ji Eun Yu<sup>1</sup>, Kyungho Min<sup>1</sup>, Jihoe Kim<sup>2</sup>, Inho Choi<sup>2</sup> and Sang-Soep Nahm<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul, Korea,

<sup>2</sup>School of Biotechnology, Yeungnam University, Gyeongsan, Korea

### ABSTRACT

Bovine serum contains various nutrients and growth factors that can be potentially used in biological experiments, drug manufacturing process and food industry. However, almost all the bovine blood has been wasted during slaughter process in Korea, thus there is a high demand for alternative uses of the wasted sera. In order to produce high quality and safe sera, it is necessary to screen zoonotic pathogens as well as other microbial contaminants to prevent any downstream contamination. The present research has been undertaken to assess biological safety of Hanwoo sera by determining microbiological contamination during slaughtering and handling processes. Serological tests have been performed to detect bacteria, mycoplasma and virus contamination in total of 52 Hanwoo sera. No sera were found to be contaminated with mycoplasma or virus, but only two sera were found to be contaminated with *Bacillus thuringiensis*. The present result shows that Hanwoo sera obtained from slaughtering process are biologically safe and have potentials to be developed as a biological reagent. Moreover, the methods employed in our study may provide basic standard for microbiological screening methods once wasted Hanwoo sera gain industrial values.

(Key words : Hanwoo, Bovine serum, Zoonoses, Biological safety)

### 서 론

현재 국내에서 도축되는 소의 혈액은 매우 제한적인 양이 일부 식품첨가물로 이용되고 있으며 대부분은 폐기되고 있는 실정이다. 특히 폐기되는 혈액은 도축장 주변 및 수질에 대한 주요 오염원으로 알려져 있어 환경적인 측면에서 많은 문제를 유발하고 있다 (Jang 등, 2011). 한편 2012년부터는 축산부산물물을 포함한 육상폐기물의 해양 투기를 금지하는 ‘해양관리법 시행규칙 개정안’의 입법이 예고되어, 앞으로 도축과정에서 발생하는 혈액폐기물의 처리를 위한 대책과 시설 마련에 많은 비용과 노력이 필요할 것으로 예상된다 (국토해양부 공고 제2011-797호).

농림수산검역검사본부의 자료에 따르면 지난 2010년에 도축된 한우는 총 752,528두로서 평균도축체중은 641 kg으로 나타났다 (농림수산검역검사본부 2010년 도축실적). 도축과정에서 방혈되는 혈액량은 체중의 약 4%로 추정되는데, 이는 마리당 약 25 l씩이며, 도축되는 한우 두수를 고려해 볼 때 연간 18,813,200 l의 혈액이 폐기되고 있는 실정이다 (The Korean Society of Veterinary

Public Health, 1996). 이와 같은 문제점을 해결하고 도축과정에서 버려지는 혈액을 활용하기 위해서 국내에서는 최근 한우 혈청을 생물학적제제로 개발할 수 있는 가능성을 평가하기 위하여 폐기되는 한우 혈액에서 혈청을 분리하는 방법 등에 대한 기초적인 연구가 활발히 수행되고 있다 (Lee 등, 2009).

현재 생명과학연구와 제약과정에서 많이 실시되고 있는 세포배양에는 소태아혈청 (fetal bovine serum, FBS), 태어난 지 20일 미만의 송아지혈청 (newborn calf serum), 12~36개월령의 소에서 채취된 소혈청 (adult bovine serum) 등 다양한 연령의 소혈청들이 생산되어 이용되고 있다. 소태아혈청은 일반적인 세포배양에 가장 많이 이용되고 있으며 다른 혈청들은 실험목적에 따라 사람에서 말라리아감염증을 일으키는 *Plasmodium falciparum* 같은 원충의 배양이나 어류 유래의 세포배양에 이용되기도 한다 (Ifediba 등, 1980; Nanda 등, 2009). 특히 한우 혈청은 생명과학 연구 분야의 실험에 가장 많이 사용되고 있는 소태아혈청과 혈액화학적 특성을 비교해 본 결과 큰 차이를 보이지는 않는 것으로 알려졌다 (Kim 등, 2011). 또한 소태아혈청과는 달리 성우의 혈청에는 성별 특이적

\* Corresponding author : Sang-Soep Nahm, College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Hwayangdong 1, Gwanjingu, Seoul, Korea. Tel: +82-2-450-3705, Fax: +82-2-450-3037, E-mail: ssnahm@konkuk.ac.kr

로 존재하는 내인성 호르몬 때문에 세포배양시 특정 세포의 성장과 분화에 영향을 미친다는 연구결과가 있어, 한우 혈청은 실험 목적에 따라 소태아혈청을 대신하여 사용될 수 있을 것으로 기대된다 (Hirata 등, 2005; Lee 등, 2011; Sinha-Hikim 등, 2003).

한편 생명과학연구용 또는 제약용으로 사용되는 동물의 혈청을 통하여 인수공통전염성질환이 사람에게 전파될 수 있는 잠재적 위험요소가 있기 때문에 한우 혈청의 산업화에는 반드시 개발된 제품과 제품사용자의 안전을 확보하기 위한 혈액의 생물학적 안전성에 대한 평가가 필수적으로 이루어져야 한다(Nijweide & Burger, 1990). 특히 소해면상뇌증(bovine spongiform encephalopathy, BSE)은 혈액을 통해서도 전염이 가능한 것으로 알려져 있다(Houston 등, 2000). 이와 같은 이유 때문에 한국은 현재 소해면상뇌증 발생 및 의심 지역으로부터의 소혈액제제의 수입을 규제하고 있다. 또한 한국에서는 아직 소해면상뇌증의 발생보고가 없고 국제수역사무국으로부터 소해면상뇌증 위험통제가능국가로 판정되어 소혈액제제 생산에 유리한 입지를 차지하고 있는 상황이다.

본 연구의 목적은 도축되는 한우 혈액으로부터 분리 정제한 혈청의 생물학적 안전성을 검증하기 위하여 한우 혈청의 세균, 마이코플라즈마, 바이러스 오염 여부를 확인하고 대량 검사방법을 확립하는 것이다. 본 연구의 결과는 매년 엄청난 양이 폐기되는 한우 혈액으로부터 고부가가치의 생물학적제제 개발에 선제조건이 되는 생물학적 안전성을 입증할 수 있는 기초연구가 될 것으로 생각된다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시재료 및 혈청분리

한우 혈액은 경상북도 영천에 위치한 주식회사 삼세도축장에서 총 52마리(암컷 17, 수컷 19, 거세 수컷 16)의 도축과정에서 방혈된 혈액을 사용하였다. 채혈은 방혈시에 배출되는 혈액을 멸균된 용기에 받아 4℃에서 6시간 보관한 뒤 4℃에서 3,000 g로 15분 동안 원심분리하고 다시 2,000g에서 30분 동안 원심분리 한 후 상층의 혈청만을 회수하여 0.22 µm 여과기(Steriflip®, vacuum driven filtration system, Millipore, USA)를 이용하여 제균하였다(Lee 등, 2009). 분리된 혈구와 여과된 혈청은 사용시까지 -80℃에서 보관하였다.

### 2. 세균학적 검사

혈청의 세균학적 오염여부는 일차적으로 일반세균 오염유무를 검사한 뒤 인수공통전염병 원인균인 브루셀라균의 오염유무를 검사하였다. 일반적인 세균오염 유무를 판단하기 위해서는 분리된 혈청 300 µl를 2.7 ml의 thioglycollate broth에 넣어 35℃에서 18시간 배양하여 증균시켰다. 세균의 동정은 배양된 세균 소량을 슬라이드에 도말하고 gram staining을 실시하여 검경하였으며, 배양된 세균은 Chocolate agar, McConkey agar, 그리고 blood agar plate에

접종하고 35℃에서 48시간 배양한 후 생성된 세균균집의 발생 여부를 확인하였다. 발생한 세균균집은 추가 동정을 위하여 세균의 16s ribosomal RNA sequence를 BigDye® Terminators Kit (Applied Biosystems, CA, USA)와 3730XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 분석하였다.

### 3. PCR을 이용한 브루셀라와 마이코플라즈마의 검출

브루셀라균과 마이코플라즈마 오염 여부는 PCR 방법을 이용하였다. 혈청 분리 과정에서 -80℃에 동결보관한 혈구세포에서 genomic DNA extraction kit(Bioneer, Korea)을 이용하여 DNA를 추출하였다. 브루셀라균 검출을 위한 PCR에 사용된 primer는 다음과 같다.

Forward primer: 5'- TCG AGC GCC CGC AAG GGG -3'

Reverse primer: 5'- AAC CAT AGT GTC TCC ACT AA -3'

마이코플라즈마 오염은 소에 특이성을 가지고 감염되는 마이코플라즈마(Table 1) 외에도 대부분의 마이코플라즈마 종에서 공통적인 염기서열을 갖는 16S ribosomal RNA를 증폭시키는 e-Myco plus mycoplasma PCR detection kit(Intron, Korea)를 이용하여 PCR을 실시하고 증폭된 유전자를 전기영동하여 오염여부를 확인하였다.

### 4. 혈청의 세포변성효과 관찰

혈청의 바이러스 오염 여부를 확인하기 위해서는 분리된 혈청을 이용하여 African green monkey kidney cells (Vero, ATCC No. CCL-81)를 배양하면서 혈청에 존재할 수 있는 바이러스에 의한 세포변성 여부를 관찰하였다(Macfarlane & Sommerville, 1969). Vero cell (2×10<sup>4</sup> cell/well)을 24 well-plate에 준비하고 Dulbeccos's modified eagle medium에 한우 혈청을 1% (v/v)씩 첨가한 배지

Table 1. List of bovine specific mycoplasma species detected by 'Mycoplasma PCR Detection Kit' used in the study

| Mycoplasma species                        | Clinical symptoms in cattle                        |
|---|--|
| <i>M. alkalescens</i>                     | Mastitis, arthritis                                |
| <i>M. bovigenitalium</i>                  | Infertility, mastitis, seminal vesiculitis         |
| <i>M. bovis</i>                           | Pneumonia, arthritis, abortions, abscesses, otitis |
| <i>M. bovoculi</i>                        | Keratoconjunctivitis                               |
| <i>M. californicum</i>                    | Arthritis, mastitis                                |
| <i>M. canadense</i>                       | Abortion, mastitis                                 |
| <i>M. dispar</i>                          | Alveolitis, bronchiolitis                          |
| <i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> | Arthritis, pleuropneumonia                         |

(Hirsh et al., 1999)

로 14일간 37°C, 5% 이산화탄소 조건에서 배양하며 관찰하였다. FBS를 첨가한 음성대조군과 인플루엔자 바이러스 (H1N1, A/NWS/33)를 접종한 양성대조군을 같이 관찰하며 비교하였다 (Govorkova 등, 1996).

## 결과 및 고찰

### 1. 세균학적 검사

일반세균 검사에 사용된 총 52개의 혈청의 세균배양 결과 2개의 혈청에서 세균이 배양되었다 (Fig. 1). 배양된 세균을 동정하기 위해 실시한 16S ribosomal RNA sequencing 결과 2개의 혈청 모두에서 *Bacillus thuringiensis*가 검출되었다 (Fig. 2). 검출된 *Bacillus thuringiensis*는 소나 사람에서 유래한 세균이 아닌 비병원성의 토양유래 세균이며, 나방에서 최초로 분리 동정되었고 곤충류 외에 일부 식물에서도 검출되는 세균으로 알려져 있다 (Roh 등, 2007). 본 실험에 사용된 혈액의 채혈은 주사기나 채혈용기를 이용하여 채혈된 재료가 아니므로 도축과정에서 항상 미생물 오염에 노출될 가능성이 높은 상황이었다. 또한 혈청 분리 후에도 혈청용 여과기로 여과하였으나 최종적으로 세균에 오염된 혈청이 있다는 것은 여과과정 또는 여과 후 보관에서도 오염이 발생할 가능성이 높다는 점을 보여준다. 세포 배양 또는 생물학적 실험에 사용되는 혈청은 무균상태를 유지해야 한다는 조건을 고려해 보면 채혈 및 혈청분리의 모든 과정이 무균적으로 이루어질 수 있는 환경이 필요할 것으로 예상된다.

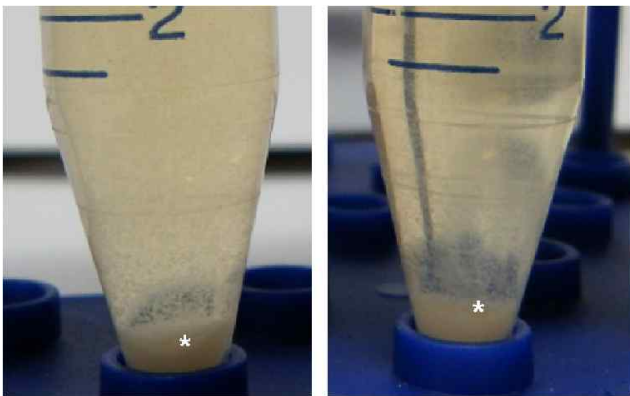


Fig. 1. Contaminated Hanwoo sera inoculation in broth. Note increased turbidity and bacterial growth (asterisk).

### 2. 브루셀라와 마이코플라즈마 검사

소의 세균성 질환 중 가축전염병예방법에서 제2종가축전염병으로 정하고 있는 대표적인 인수공통전염병인 브루셀라감염증의 지난 7년간 발생 통계를 살펴보면 감소추세이기는 하나 연평균 1,958건에 11,410두수가 감염된 것으로 확인되고 있다 (국가동물방역통합

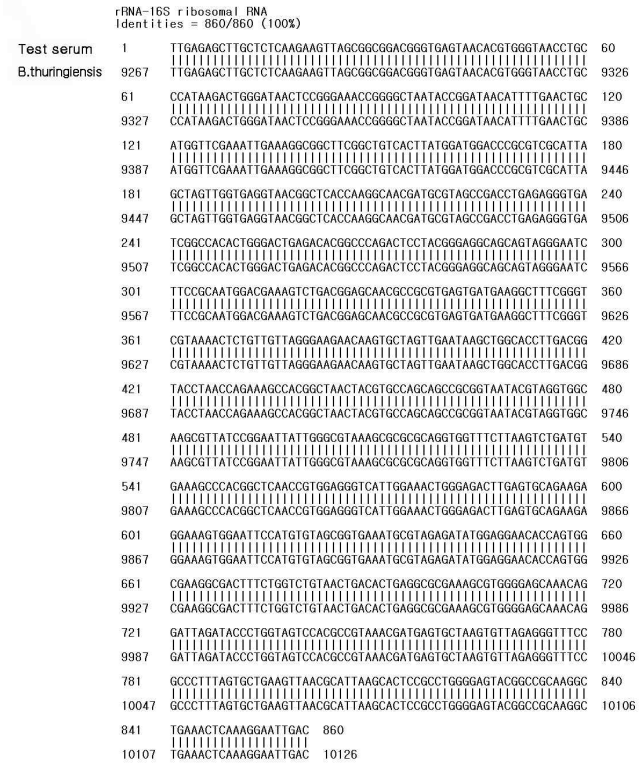


Fig. 2. Result of 16s rRNA sequencing analysis of *Bacillus thuringiensis* detected in bacterial culture. The sequence from test serum was compared and aligned with sequence for *B. thuringiensis*. Vertical lines indicate identical sequences.

시스템, 2004~2010). 국내의 도축과정에는 브루셀라감염증에 대한 음성 판정을 받은 소들만이 도축장에 반입되기 때문에 예상했던 대로 모든 혈청에서 브루셀라균이 검출되지 않았다.

한편 PCR 방법을 이용하여 검사한 모든 혈청에서 마이코플라즈마에 오염된 혈청은 검출되지 않았다 (Fig. 3). 모든 PCR 과정에는 internal control이 동시에 수행되어 PCR 과정에서의 오류가 있는 경우 재실험을 실시하여 실험의 정확성을 담보할 수 있었다. 마이코플라즈마 오염은 세포를 배양함에 있어 많은 문제점을 유발한다. 특히 일반적인 배양 과정에서 세포가 마이코플라즈마에 감염된 경

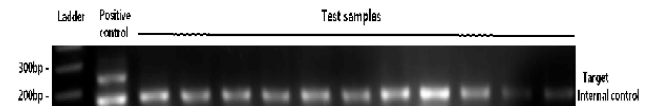


Fig. 3. A representative result of mycoplasma PCR reaction using DNA extracted from Hanwoo blood samples. A band at 260 base pair (bp) is the target control, which shows amplification of conserved 16S rRNA region from mycoplasma. Multiple bands at 160bp indicate internal controls assuring occurrence of false negative amplifications.

우 세포의 증식속도가 늦추어지거나 면역학적 반응을 일으키는 것으로 알려져 있다(McGarrity 등, 1984 Muhlradt 등, 1996).

### 3. 한우 혈청의 세포변성효과 관찰

소에 감염되는 바이러스는 그 종류가 매우 다양하고 모든 바이러스 감염여부를 한 가지씩 확인하는 것은 불가능하며 특정 바이러스에 감염된 경우라도 증상이 없는 경우 도축과정에서 실시되는 신체 검사에서 발견되지 않는다. 따라서 혈액 내에 바이러스 존재 유무를 확인하기 위해서는 검사할 혈청을 Vero cell 배양 배지에 첨가하여 Vero cell이 변성을 일으키는지 확인한 뒤에 세포변성이 있는 경우에 한하여 바이러스 동정이 이루어진다(Animal and Plant Health Inspection Service, USDA, 2011).

바이러스에 의한 세포변성효과는 감염된 바이러스의 종류에 따라 원형화, 거대세포, 합포체 및 세포질내 봉입체 생성 등의 다양한 형태로 나타나는 것으로 알려져 있다. 특히 배양된 세포에 구제역 바이러스가 감염되면 세포골격의 변화에 따른 세포 모양의 변형과 세포의 탈락을 관찰할 수 있다(Armer 등, 2008). 본 실험에서는 세포배양용 배지에 검사할 한우 혈청을 첨가한 뒤 Vero cell을 배양하여 세포변성효과를 관찰한 결과 어떠한 세포변성효과도 관찰되지 않았다. 반면 저병원성 인플루엔자 바이러스를 인위적으로 감염시킨 양성대조군에서는 합포체 형성과 같은 세포변성효과가 관찰되었다(Fig. 4). 이와 같은 결과는 세균 및 마이코플라스마 뿐 아니라 한우 혈청이 미지의 바이러스나 곰팡이 등에 오염되지 않았음을 보여주는 것이다.

본 실험을 통해 검사를 실시한 모든 한우 혈청에서 사용자의 안전을 위협하고 생물학적 실험 또는 제품생산에 부정적인 영향을 미칠 수 있는 전염성 미생물은 발견되지 않았다. 이는 도축과정에서 얻을 수 있는 한우 혈청은 제균 과정을 통하여 생물학적 제제로 사용할 수 있다는 안전성을 입증한 것과 동시에 한국의 도축과정이 브루셀라감염증이나 마이코플라스마와 같이 국내에서 꾸준히 발생하고 있는 질병에 감염된 개체를 사전에 충분히 선별해 낼 수 있는 제도적 장치를 갖추고 있다는 것을 간접적으로 보여주는 것으로 판

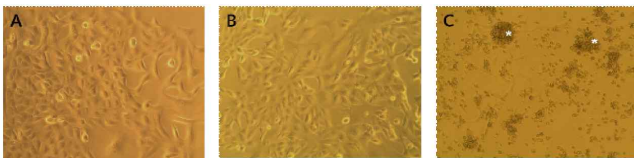


Fig. 4. Hanwoo sera were screened for unknown virus contamination by observing manifestation of cytopathic effect in Vero cells. A: Vero cells cultured with FBS supplemented media. B: Vero cells cultured with Hanwoo serum supplemented media. C: Cytopathic effect was induced by artificial low-pathogenic influenza virus infection in Vero cells cultured with FBS supplemented media. Note syncytium formation (asterisk).

단된다. 그러나 더욱 위생적인 혈액을 확보하기 위해서는 도축장 내에 무균적으로 혈액을 채취할 수 있는 시설과 냉각 용기 등이 설치 되어야 한우 혈액을 산업적으로 이용할 수 있을 것이다. 한편 본 실험에서 혈청의 생물학적 안전성을 평가하기 위해 사용항방법과 항목 등은 추후에 도축부산물의 위생관리를 위한 법적 관리 기준과 한우 혈청 제제 생산 기술의 산업화 과정에 필요한 위생관리 절차(sanitation standard operating procedure, SSOP) 마련에 도움을 줄 것으로 생각된다.

## 요 약

본 연구에서는 성체 한우의 도축과정 중에 채혈된 혈액으로부터 분리 정제한 혈청의 생물학적 안전성을 검증하기 위하여 세균, 마이코플라스마 및 바이러스의 검출과 동정을 실시하였다. 검사를 실시한 대부분의 혈청에서 전염성 병원체가 검출되지 않았고 두 개의 혈청에서 토양 유래의 것으로 추정되는 *Bacillus thuringiensis*가 검출 되었다. 본 연구의 결과는 국내에서 도축되는 한우는 생물학적 안전성을 담보할 수 있는 최소한의 기본적인 안전장치를 통해 도축된다는 사실을 보여주며 한우의 도축과정에서 부산물로 얻을 수 있는 혈액을 안전한 생물학적 제제로 개발할 수 있다는 가능성을 보여주는 것으로 생각된다.

(주제어: 한우, 소혈청, 인수공통전염병, 생물학적 안전성)

## 사 사

본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ007472)의 지원에 의해 이루어진 것임.

## 인 용 문 헌

Armer, H., Moffat, K., Wileman, T., Belsham, G. J., Jackson, T., Duprex, W. P., Ryan, M. and Monaghan, P. 2008. Foot-and-mouth disease virus, but not bovine enterovirus, targets the host cell cytoskeleton via the nonstructural protein 3Cpro. *J Virol* 82:10556-10566.

Govorkova, EA., Murti, G., Meignier, B., de Taisne, C. and Webster, RG. 1996. African green monkey kidney (Vero) cells provide an alternative host cell system for influenza A and B viruses. *J Virol* 70:5519-5524.

Hirata, F., Yoshida, M., Niwa, Y., Okouchi, M., Okayama, N., Takeuchi, Y., Itoh, M. and Ogura, Y. 2005. Insulin enhances leukocyte-endothelial cell adhesion in the retinal microcirculation through surface expression of intercellular adhesion molecule-1. *Microvasc Res* 69:135-141.

Hirsh, D., MacLachlan, N. and Wlaker, R. 1999. Chapter 40. Mollicutes, *Veterinary Microbiology*, 2<sup>nd</sup> edition, Blackwell

- publishing, pp 240-249.
- Houston, F., Foster, JD., Chong, A., Hunter, N. and Bostock, CJ. 2000. Transmission of BSE by blood transfusion in sheep. *Lancet* 356:999-1000.
- Ifediba, T. and Vanderberg, J. P. 1980. Peptones and calf serum as a replacement for human serum in the cultivation of *Plasmodium falciparum*. *J Parasitol* 66:236-239.
- Jang, Y., Kim, H., Lee M., Baek, H. and Choe, N. 2011. Utilization and hygiene status of animal blood from slaughterhouse in Korea. *Kor J Vet Publ HLth* 35:73-79.
- Kim, J., Kim, M., Nahm, SS., Lee, DM., Pokharel, S. and Choi, I. 2011. Characterization of gender-specific bovine serum. *Animal Cells and Systems* 15:147-154.
- Lee, DM., Choi, MS., Woo, GI., Shin, YM., Lee, KH., Chun, YP., Chun, T. and Choi, I. 2009. Effect of gender-specific bovine serum supplemented medium on cell culture. *J Anim Sci Technol* 51:413-420.
- Lee, DM., Bajracharya, P., Lee, EJ., Kim, JE., Lee, HJ., Chun, T., Kim, J., Cho, KH., Chang, J., Hong, S. and Choi, I. 2011. Effects of gender-specific adult bovine serum on myogenic satellite cell proliferation, differentiation and lipid accumulation. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 47:438-444.
- Macfarlane, DE. and Sommerville, RG. 1969. VERO cells (*Cercopithecus aethiops* kidney)--growth characteristics and viral susceptibility for use in diagnostic virology. (Brief report). *Arch Gesamte Virusforsch* 27:379-385.
- McGarrity, GJ., Vanaman, V. and Sarama, J. 1984. Cytogenetic effects of mycoplasma infection of cell cultures: a review. *In Vitro* 20:1-18.
- Muhlradt, PF., Meyer, H. and Jansen, R. 1996. Identification of S-(2,3-dihydroxypropyl) cystein in a macrophage-activating lipopeptide from *Mycoplasma fermentans*. *Biochemistry* 35:7781-7786.
- Nanda, PK., Swain, P., Nayak, SK., Dash, S., Routray, P., Swain, SK. and Patra, BC. 2009. Goat serum as an alternative to establish cell culture from Indian major carp, *Cirrhinus mrigala*. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 45:148-151.
- Nijweide, PJ. and Burger, EH. 1990. Mechanism of bone formation *in vitro*. In *The osteoblast* (Ed. B. K. Hall), Telford Press, Caldwell, New Jersey. 1:303.
- Roh, JY., Choi, JY., Li, MS., Jin, BR. and Je, YH. 2007. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. *J Microbiol Biotechnol* 17:547-559.
- Sinha-Hikim, I., Roth, SM., Lee, MI. and Bhasin, S. 2003. Testosterone-induced muscle hypertrophy is associated with an increase in satellite cell number in healthy, young men. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285:E197-205.
- The Korean Society of Veterinary Public Health. 1996. Chapter 21. Meat hygiene, *Veterinary Public Health*, 3<sup>rd</sup> Ed. Munundang, pp361-448.
- USDA. 2011. Animal and Plant Health Inspection Service: Part 113.53 Requirements for ingredients of animal origin used for production of biologics, United States Department of Agriculture, Washington D.C, USA.

(Received Sep. 20, 2011; Revised Oct. 31, 2011; Accepted Nov. 9, 2011)