

명세서

발명의 명칭: 3차원 바이오프린팅 기술을 이용한 생선근육 형태 모사 근육을 포함하는 배양생선의 제조방법 및 이에 의해 제조된 배양생선

기술분야

- [1] 본 기재는 3차원 바이오프린팅 기술을 이용한 생선근육 형태 모사 근육을 포함하는 배양생선의 제조방법 및 이에 의해 제조된 배양생선에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 2050년 세계 인구는 약 98억 명, 필요한 동물 단백질 수는 연간 4.5억 톤(FAO, 2019)으로 전망되며, 단백질 위기에 직면할 것으로 예상된다. 또한 지구 온난화와 같은 기후변화로 인한 농경지 및 작물의 수확량 감소, 코로나바이러스 감염증에 따른 가축 집단 폐사, 전쟁에 따른 곡물 가격의 급등 등 사료용 곡물의 수요 대비 생산비가 오르고 생산면적이 줄어들게 되어 축산물은 점점 더 고가의 먹거리가 될 것으로 보고 있다.
- [3] 한편, 생선으로 대표되는 해양수산물의 경우 가금류, 소, 돼지를 대체할 수 있는 최적의 단백질 공급원으로 육류대비 필수단백질 함량이 높고 지방 함량이 낮으며 비타민 D, E 그리고 무기질이 육류보다 많이 포함되어 있다. 하지만, 미세플라스틱에 따른 건강 악영향, 원전사고 등으로 인한 방사성 오염수 피폭문제, 중금속 축적 문제, 해수온도 변화에 따른 어류의 멸종, 혼획 및 남획에 따른 물고기 개체수 감소 등으로 해양수산물은 점점 더 오염되고 줄어들 것으로 보고 있다.
- [4] 배양생선은 어업 및 양식업이 아닌, 연구환경에서 살아 있는 어류 세포를 대량배양하여 얻게 되는 식용생선을 의미한다. 세포를 배양하여 만들어진 해양수산물로 세포기반 수산물(cell-based seafood) 혹은 세포배양 수산물(cell-cultured seafood)로 불린다. 이때, 어류 세포는 살코기가 되는 근육줄기세포 혹은 근원세포를 의미한다.
- [5] 하지만, 현재까지 알려진 배양생선 제조기술은 대부분 세포를 지지하는 스캐폴드(scaffold)를 활용하고 있다. 스캐폴드 제조기술은 염침출법(salt leaching), 염발포법(gas forming)에 의한 불균일한 공극으로 이루어져 있으며 세포를 그 위에 파종하므로 불균일한 형태의 근육조직으로 최종 조직화된다. 또한 근육의 복잡한 미세구조를 모사할 수 없다.
- [6] 따라서, 미래 식량 안보를 해결하고 소비자의 거부감을 없애기 위해서는 실제 생선근육 형태와 식감을 모사할 수 있는 기술이 필요하다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 일 구현예에는 실제 생선근육 형태와 식감을 구현할 수 있는 식용 가능한 배양생선의 제조방법을 제공하려는 것이다.
- [8] 다른 일 구현예에는 실제 생선근육 형태와 식감을 가지는 배양생선을 제공하려는 것이다.

과제 해결 수단

- [9] 일 구현예에 따르면, 배양생선용 세포와 식용 바이오잉크를 혼합하여 세포 프린팅용 잉크를 준비하는 단계, 상기 세포 프린팅용 잉크를 생선근육 모사 패턴으로 프린팅하여 적층 구조체를 형성하는 단계, 상기 적층 구조체에 가교제를 첨가하는 단계 및 상기 가교제가 첨가된 적층 구조체를 생선 근육 조직으로 배양하는 단계를 포함하는 3차원 바이오프린팅 기술을 이용한 생선근육 형태 모사 근육을 포함하는 배양생선의 제조방법을 제공한다.
- [10] 다른 구현예에 따르면, 생선근육 유래 세포를 포함하는 근육조직이 층층이(Layer by Layer) 적층된 배양생선을 제공한다.

발명의 효과

- [11] 일 구현예에 따른 배양생선 제조방법은 실제 생선근육의 'W' 형태를 모사할 수 있도록 근육세포를 정렬하여 실제 생선근육 형태와 식감이 구현된 식용가능한 배양생선을 제공할 수 있다.
- [12] 종래 다공성 지지체(스케폴드)를 이용한 경우 기공도가 커, 기계적 물성이 낮고 세포가 부착할 수 있는 공간은 지지체의 공극에 의존하는 문제가 있으며, 최종적으로 제작되는 배양생선에서 근육의 함량이 제한적인 문제가 있었으나, 일 구현예에 따르면, 세포와 식용 바이오잉크를 섞어 세포 프린팅용 잉크를 제조한 뒤 이를 이용하여 프린팅한 뒤 배양하므로 세포 함량을 조절할 수 있으며 세포가 세포외기질(extracellular matrix)에 둘러 쌓여 실제 생선과 유사한 환경을 제공할 수 있다. 따라서, 실제 생선과 유사한 식감을 모사할 수 있다.
- [13] 또한 일 구현예에 따른 배양생선 제조 방법은 식용 바이오잉크의 함량을 조절함으로써 세포의 환경을 용이하게 조절할 수 있다.
- [14] 또한 일 구현예에 따른 배양생선 제조를 위한 프린팅 토출시 프린터 노즐의 내경, 프린팅 공압 및/또는 바이오잉크의 점도를 제어하여 시편에 원하는 전단응력(shear stress)을 가할 수 있고 이에 따라 세포 정렬을 가속화시켜 실제 생선근육 형태 및 식감을 모사하는 배양생선을 제조할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [15] 도 1은 생선 근육조직 모사를 위한 프린팅 패턴의 기본 조합을 나타내는 예시도이다.
- [16] 도 2a 내지 도 2c는 생선 근육조직 모사를 위한 LBL 프린팅 방식에서 패턴의 적층예들을 나타내는 예시도들이다.
- [17] 도 3은 생선의 등근 형태 모사에 적합한 오프-셋 적층 방법의 예시도이다.
- [18] 도 4는 조피볼락 생선으로부터 추출된 근육줄기세포를 나타낸다.

- [19] 도 5는 바이오프린팅으로 출력된 배양생선 적층 구조체의 형태학적 모습을 나타내는 이미지들이다.
- [20] 도 6은 4주간 세포배양 이후 근육조직이 생성된 배양생선의 이미지이다.
- [21] 도 7은 배양생선의 조리 후 이미지들이다.
- [22] 도 8은 근육줄기세포의 스케폴드 배양과 세포프린팅 배양의 차이를 나타내는 형광 이미지이다.
- [23] 도 9는 근육줄기세포의 스케폴드 배양과 세포프린팅 배양에 따라 형성된 세포의 중형비를 측정한 결과이다.
- [24] 도 10은 근육줄기세포의 스케폴드 배양과 세포프린팅 배양에 따라 형성된 세포의 반치전폭을 측정한 결과이다.
- [25] 도 11은 스케폴드 배양과 세포프린팅 배양에 따라 형성된 배양생선의 Myogenin, MyoD, 및 MyHC의 mRNA 발현량을 측정한 결과이다.
- [26] 도 12는 식용 바이오잉크의 조성을 달리한 후 배양 1일차 및 배양 4일차에 측정한 형광이미지들이다.
- [27] 도 13은 식용 바이오잉크의 프린팅 형태에 따른 압축강도 및 인장강도의 측정값을 나타내는 그래프들이다.
- [28] 도 14는 세포 농도를 달리하여 적층 구조체를 형성한 후 배양 3일차 및 배양 7일차에 측정한 형광이미지들이다.
- [29] 도 15는 바이오프린팅시 공압을 달리하여 적층 구조체를 형성한 후 배양 3일차 및 배양 7일차에 측정한 형광이미지들이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [30] 이하, 본 발명의 구현예에 대하여 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 구현예에 한정되지 않는다.
- [31] 이하 일 구현예에 따른 배양생선의 제조 방법에 대해 설명한다.
- [32] 배양생선의 제조를 위해서 먼저 배양생선용 세포와 식용 바이오잉크를 혼합하여 세포 프린팅용 잉크를 준비한다.
- [33] 배양생선용 세포는 배양 대상 생선의 근육줄기세포(myosatellite cell, muscle stem cells) 또는 근원세포(myoblast)를 포함할 수 있다. 근육줄기세포 또는 근원세포는 외부에서 구입하여 사용할 수 있다. 필요에 따라서는 배양하고자 하는 생선의 흰살 부분으로부터 근육줄기세포 또는 근원세포를 추출하여 사용할 수 있다. 일례로, 배양하고자 하는 생선의 흰살을 분리하여 배양배지에 담지하고 세척한 후 원심분리하여 상층액을 제거하고 하층액을 콜라겐분해효소(collagenase)로 분해한다. 분해물을 원심분리하여 상층액을 제거하고 하층액을 배양배지에 담지하여 배양하여 근육줄기세포 또는 근원세포를 추출하여 사용할 수도 있다.

- [34] 배양생선의 식감을 보다 실제 생선과 유사하게 낼 수 있도록 하기 위해서 배양생선용 세포는 생선 지방 유래 세포 또는 생선 혈관 유래 세포를 더 포함할 수 있다. 예를 들면, 지방줄기세포, 지방세포, 혈관내피줄기세포 및 혈관내피세포로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 세포를 더 포함할 수 있다. 지방줄기세포, 지방세포, 혈관내피줄기세포 및 혈관내피세포 또한 근육줄기세포 또는 근원세포와 마찬가지로 외부에서 구입하여 사용하거나 생선 지방 또는 혈관으로부터 직접 추출하여 사용할 수도 있다.
- [35] 식용 바이오잉크는 알지네이트를 포함할 수 있다.
- [36] 알지네이트는 다당류로써 미역, 다시마와 같은 조류(algae)에서 추출되고 생체적합성이 뛰어나고 독성이 낮으며 가격이 저렴하다. 특히, 알지네이트는 2가 양이온인 칼슘(Ca^{2+}), 바륨(Ba^{2+}), 스트론튬(Sr^{2+}), 마그네슘(Mg^{2+}), 망간(Mn^{2+}), 아연(Zn^{2+})과 이온 가교(ionic cross-linking)를 통해 쉽고 빠르게 하이드로겔화된다. 따라서, 알지네이트는 프린팅 직후 이온 가교를 통해 배양생선의 구조를 즉각적으로 유지시켜주는 기능이 있다.
- [37] 식용 바이오잉크는 알지네이트 이외에 콜라겐, 젤라틴 및 키토산(chitosan)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 물질을 더 포함할 수 있다.
- [38] 다당류인 알지네이트에는 세포 부착분자(cell adhesion molecule)가 없고 음전하를 띄기 때문에 세포가 알지네이트에 부착하지 못한 채 응집(aggregation)되어 자랄 수 있다. 따라서, 세포의 부착성을 높일 수 있는 물질을 혼합해주는 것이 바람직하다.
- [39] 젤라틴은 약 37°C 이상에서는 액상으로 변하고 약 25°C 이하에서는 하이드로겔화 되는 특성이 있다. 또한, 트립토판(tryptophan)과 시스틴(cystine)을 제외한 필수아미노산을 모두 함유하고 있어 영양적 가치가 높다. 따라서, 알지네이트와 혼합시 세포의 증식, 부착, 이동성을 향상시켜 세포 조직화에 도움을 줄 수 있다.
- [40] 콜라겐 또는 키토산 또한 젤라틴과 같은 효능을 부여할 수 있다. 즉, 알지네이트와 혼합하면 알지네이트의 이온 가교에 의해 구조를 안정적으로 유지할 수 있으며 세포의 증식, 부착, 이동성을 향상시켜 세포가 조직화되는 것에 도움을 줄 수 있다.
- [41] 콜라겐으로는 아테로콜라겐 또는 콜라겐 펩타이드가 사용될 수 있다.
- [42] 일 실시형태에 있어서, 알지네이트는 1~5 w/v % 함량으로 사용될 수 있다.
- [43] 젤라틴의 농도는 1~30 w/v % 및/또는 콜라겐의 농도는 1~10 w/v % 로 사용될 수 있다.
- [44] 추가로 식용 바이오잉크는 pH 조절제를 더 포함할 수 있다. 식용 바이오잉크의 pH는 7.0 ~ 7.5 일 수 있다.
- [45] 배양생선용 세포와 식용 바이오잉크를 혼합하여 세포 프린팅용 잉크를 준비할 때, 세포는 식용 바이오잉크에 1×10^6 세포/mL 내지 1×10^{10} 세포/mL의 농도로 혼합될 수 있다. 1×10^6 세포/mL 농도 보다 낮은 경우 세포와 세포간 간격이 넓어

조직화가 충분히 이루어지기 어렵고, 1×10^{10} 세포/mL 농도 보다 높은 경우 혼합되어야 하는 하이드로겔의 부피보다 세포의 부피가 크므로 해당 농도로 혼합이 어렵다.

- [46] 세포 프린팅용 잉크의 점도는 식용바이오 잉크의 최종농도와 세포 수에 비례하여 증가할 수 있다. 따라서, 식용바이오 잉크의 최종농도와 세포수를 제어하여 세포 프린팅용 잉크의 점도를 제어할 수 있다.
- [47] 이어서, 세포 프린팅용 잉크를 층층이(Layer by Layer, LBL) 프린팅하여 적층 구조체를 형성한다.
- [48]
- [49] *적층 구조체는 하나의 패턴으로만 적층되기보다는 서로 다른 패턴 A와 패턴 B가 적층된 구조체로 형성되는 생선 근육 조직 모사에 보다 적합할 수 있다. 적층 방식은 패턴 A와 패턴 B를 교대로 적층할 수도 있고, 한 패턴을 2회 이상 반복하여 적층한 후 다른 패턴을 2회 이상 반복하여 적층하는 것을 교대로 하여 적층할 수도 있다. 이 경우 인접하는 패턴 A는 서로 오프셋되어 형성되는 것이 생선 근육 모사에 보다 적합할 수 있다. 따라서 층층이라는 의미에는 동일 패턴층으로만 이루어진 경우 이외에도 동일 패턴층 사이에 다른 패턴층이 존재하는 경우도 포함하는 의미로 해석될 수 있다.
- [50] 일 예로 패턴 A와 패턴 B는 격자 구조를 형성될 수 있다.
- [51] 다른 일 예로 도 1에 예시되어 있는 바와 같이 패턴 A는 W 형태로 생선 근육조직 모사 형태로 구성되고 패턴 B는 패턴 A와 교차하는 라인 패턴으로 구성될 수 있다. 프린팅 후 배양시 패턴 A(W 패턴)은 근육조직층으로 패턴 B는 결합조직층으로 분화하여 실제 생선의 모양 및 식감을 내도록 할 수 있다. 배양생선의 패턴 A의 각도는 20도 내지 70도이며, 패턴간 간격은 0.5 mm 내지 3 mm 일 수 있다.
- [52] 생선의 근육조직은 가축류와 달리 근섬유의 길이가 짧고 두꺼우며 근육과 뼈 사이의 결합조직이 약하기 때문에 육고기보다 부드럽다. 이때 생선을 옆에서 볼 때, 하나의 개별 근육인 근판(myotome)은 'W' 형태 즉 지그재그 형태로 접혀져 있다. 바로 다음 개별 근육인 근판은 결합조직(myosepta)에 의해 연결되어 있으며 최종적으로는 지그재그로 근판들이 연속적으로 연결된 형태이다. 이때 근판들은 생선을 앞에서 볼 때, 서로 일렬로 정렬되지 않고 피라미드 구조로 비스듬히 겹쳐져 있는데 이는 생선 자체가 타원형 구조이기 때문이다. 따라서, 근판들의 형태와 크기는 몸통에서 가장 크고 머리와 꼬리쪽으로 갈수록 작아진다. 이러한 기하학적 구조는 물고기가 효율적으로 나아갈 수 있는 물결모양 운동(undulatory motions)을 만들어낸다. 따라서, 배양생선이 실제 생선의 식감을 내기 위해서는 'W' 형태의 기하학적 형상과 각 근육결들의 연속적인 경사를 모사할 수 있어야 한다. 이에 도 1에 예시되어 있는 바와 같이 패턴 A는 W 형태로 생선 근육조직 모사 형태로 구성되고 패턴 B는 패턴 A와 교차하는 라인 패턴으로 구성되어 결합조직 모사 형태가 될 수 있도록 하는

것이다.

- [53] 도 2는 패턴 A와 패턴 B의 다양한 LBL 프린팅 방식을 나타낸다. 도 2에서는 6층을 예시하고 있으나 층수에는 제한이 있는 것은 아니며 형성하고자 하는 배양 생선의 두께에 따라 조절할 수 있다. 예를 들면 50층 수준까지 적층하여 제조할 수 있다. 한층씩 교차 적층하거나(ABABAB)(도 2a), 하나의 패턴을 두층 반복한 후 교차 적층하거나(AABBAA)(도 2b), 하나의 패턴을 삼층 반복한 후 교차 적층하는(AAABBB)(도 2c) 방식으로 다양하게 변형될 수 있다.
- [54] 적층의 시작을 패턴 A(W 패턴)로부터 시작하는 것이 바람직하다. 최종 적층 후 구조물을 취득할 때 패턴 A의 단면적이 패턴 B보다 높고 안정적으로 취득이 가능하기 때문이다.
- [55] 한편, 도 3에 예시되어 있는 바와 같이 생선의 타원형 형태를 모사하기 위하여 인접하는 동일 패턴은 오프-셋(off-set)되어 배치될 수 있다. 예를 들면, 하부층의 패턴 A(1)와 다음층의 패턴 A(2)는 시작점을 각각 0.5mm 내지 1mm 엇갈려서 적층할 수 있다. 이와 같이 함으로써 생선 식감에 보다 근접한 배양생선을 제조할 수 있다.
- [56] 일 실시형태에 있어서, 3차원 프린팅에 사용되는 프린터의 노즐의 내경은 18G 내지 32G 혹은 1.00 mm 내지 0.10 mm 일 수 있다. 이때, 프린팅 가능한 공압은 2kPa 내지 500 kPa일 수 있다. 프린터의 X,Y 축 이송속도는 50 mm/min 내지 500 mm/min일 수 있다. 프린터 헤드부의 온도 범위는 영하 10°C 내지 영상 40°C일 수 있다. 프린팅 베이스의 온도 범위는 영하 10°C 내지 영상 40°C일 수 있다. 이들 파라미터들은 세포 프린팅용 잉크의 점도와 함께 제조하고자 하는 배양생선의 두께 질감 등에 따라 다양하게 조절가능한 파라미터일 수 있다. 이 중에서 프린터의 노즐 내경 및 프린팅 공압을 세포 프린팅용 잉크의 점도와 함께 제어하여 시편에 원하는 전단응력을 가할 수 있고 이에 따라 세포 정렬을 가속화시켜 생선근육 형태 및 식감을 모사하는 배양생선을 형성하기 위한 적층 구조체를 제조할 수 있다.
- [57] 일 실시형태에 있어서, 배양생선의 형태는 자유롭게 프린팅할 수 있으며, 정사각형, 직사각형, 원형, 유아식을 위한 생선모형, 공룡모형 등의 자유형상으로 제조될 수도 있다.
- [58] 이어서, 적층 구조체에 가교제를 첨가한다.
- [59] 가교제는 배양생선의 구조를 유지하기 위해 첨가될 수 있다. 가교제는 염화칼슘(CaCl_2), 염화마그네슘(MgCl_2), 인산칼슘(CaP), 탄산칼슘(CaCO_2), 염화바륨(BaCl_2) 및 염화스트론튬(SrCl_2) 로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 가교제일 수 있다.
- [60] 마지막으로 가교제가 첨가된 적층 구조체를 생선 근육 조직으로 배양한다.
- [61] 배양 단계는 세포가 식용 바이오잉크 내에서 토출된 방향으로 정렬되는 단계와 상기 세포가 분화되어 근육 조직이 형성되는 단계를 포함한다.
- [62] 배양시 사용하는 배양액은 일반적인 줄기세포의 성장 배지를 적용할 수

있으며, 배양생선의 배양에 적합하게 변형될 수 있다.

- [63] 그 결과 생선근육 형태 모사 W 형태의 근육조직을 포함하는 배양생선이 완성된다.
- [64] 배양생선 내에서 정렬된 근육줄기세포의 종횡비(cell aspect ratio)는 세포 핵의 최대길이/최소길이나 세포 질의 최대길이/최소길이나 산출될 수 있다. 예를 들면, 정렬된 근육줄기세포의 핵의 종횡비는 2.0 내지 5.0 일 수 있다. 정렬된 근육줄기세포의 세포 골격 혹은 세포 질의 종횡비는 3.0 내지 10.0 일 수 있다.
- [65] 근육줄기세포의 정렬된 방향성은 반치전폭(FWHM, full width at half maximum)으로 계산될 수 있으며, 정렬된 근육줄기세포의 반치전폭은 1° 내지 20° 일 수 있다. 반치전폭은 세포의 정렬각도 스펙트럼 상에서 첨두값(peak)의 절반이 되는 위치에서의 스펙트럼 폭을 말한다
- [66] 근육줄기세포의 분화정도는 Myogenin 유전자, MyoD (myoblast determination protein) 유전자, 또는 MyHC(Myosin heavy chain) 유전자의 발현 여부로 확인될 수 있다.
- [67]
- [68] 이하 실시예를 통하여 상술한 본 발명의 구현예를 보다 상세하게 설명한다. 다만 하기의 실시예는 단지 설명의 목적을 위한 것이며 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 배양생선 제조방법에 대해 상세히 설명한다.
- [69]
- [70] 3차원 바이오프린팅 기술을 이용한 생선근육 형태 모사 근육을 포함하는 배양생선의 제조
- [71] 세포 배양 및 세포 준비단계
- [72] 조피볼락 등쪽의 흰살 부분을 분리하여 DMEM/Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM/F12, Gibco™, 11320033) 배양배지와 Leibovitz's L-15 Medium (L-15, Gibco™, 11415064) 배양배지가 1:1로 혼합되고 10mM HEPES(Gibco™, 15630080), 5% PenStrep(Gibco™, 15140122)이 함유된 4°C의 혼합 배양배지에 10분간 담지하였다. 다음, 4°C의 70% ethanol로 30초간 세척하고 5% PenStrep이 함유된 PBS(Phosphate-Buffered Saline)로 3회 세척하였다. 의료용 칼을 이용하여 0.5~3 mm³ 크기로 자른 후 0.25 µg/mL 농도의 Amphotericin B(Sigma Aldrich, PHR1662)와 75 µg/mL 농도의 gentamicin(Sigma Aldrich, G1397)이 추가로 함유된 혼합배지에 담지하고 4°C 온도, 100g 속도에서 원심분리 하였다. 원심 분리 후, 상층액을 제거하고 이를 4회 반복하였다. 이후 조직을 Collagenase I(Gibco™, 17018029)이 625IU/mL의 농도로 혼합된 혼합배지에 1시간 동안 상온에서 담지하였다. 이후, 4°C 온도 100g 속도에서 원심분리하여 상층액을 제거하고 이를 4회 반복하였다. 조직을 DMEM/F12 배양배지와 L-15 배양배지가 1:1로 혼합되고 추가적으로 1% MEM Non-Essential Amino Acids Solution(Gibco™,

11140050), 20% FBS(Gibco™, 16000044), bFGF (1ng/mL, Gibco™, PHG0311)이 함유된 혼합배지에 담지하였다. 이후 조직을 T-flask에 부착하고 혼합배지를 제거하여 30분간 말려주었다. 이후, 혼합배지를 채워 18시간 동안 24°C의 온도에서 배양한 뒤 배양배지를 100% 추가해준 뒤 3일간 배양하였다. 이후 2일간격으로 혼합배지의 50%를 제거하고 새로운 혼합배지 50%를 추가하여 7일간 배양하여 근육줄기세포를 추출하였다. 도 4에 조피볼락으로부터 추출된 근육줄기세포가 도시되어 있다.

[73] 바이오잉크 및 세포 프린팅용 잉크 제조 단계

[74] 식용 바이오 잉크는 알지네이트, 젤라틴 및 콜라겐 펩타이드를 사용하여 제조하였다. 3% 알지네이트, 5% 젤라틴, 10% 콜라겐 펩타이드 및 3% 겔착제를 음용수를 이용하여 24시간 이상 교반기 위에서 완전히 녹여 제작하였고 NaHCO₃를 이용하여 pH7.4가 되도록 적정해주었다. 이후, 세포를 1x10⁸ 세포/mL의 농도로 바이오잉크와 물리적으로 혼합하여 세포 프린팅용 잉크를 제조하였다.

[75] 3D 프린터를 이용한 적층 구조물 프린팅 단계

[76] 배양생선 구조물은 solid works 3차원 렌더링 프로그램을 사용하여 제작한다. 배양생선은 3D 프린터를 이용하여 제조하였고 압력, 프린팅 속도, 온도 및 잉크의 배합 농도 등을 적절하게 조절하여 구조를 제작하였다.

[77] 이때 사용된 프린팅 압력은 100kPa, 속도는 200mm/min, 온도는 25°C로 조절하여 제작하였다. 도 1에 예시된 근육세포조직과(Pattern A) 결합조직을(Pattern B) 한 번씩 교차하여 적층하되 도 3에 예시되어 있는 바와 같이 인접하는 패턴 A는 서로 오프-셋 되는 구조로 배양생선을 프린팅하였다. 도 5에 3차원 프린팅 직후의 적층 구조물이 예시되어 있다.

[78] 적층 구조물 가교 단계

[79] 도 5에 예시되어 있는 적층 구조물은 식용 150 mM 염화칼슘(CaCl₂)를 이용하여 가교시켜 모양을 유지시켜주었고, 37°C 인큐베이터에서 1시간 동안 물리적으로 겔화시켰다.

[80] 배양 단계

[81] 겔화된 적층 구조물을 25°C의 바이오 리액터에서 배양했다. 바이오 리액터에 공급되는 배양용 혼합배지는 바이오 리액터에서 자동으로 교환되고 28일간 100rpm, 25°C pH7.4의 조건에서 배양했다. 4주간 세포배양 이후 근육조직이 생성된 배양생선이 도 6에 예시되어 있다.

[82] 배양생선 가공 및 요리 단계

[83] 도 6에 예시된 배양생선은 음용수에 행구어준 후 도 7과 같이 튀기거나 찌는 등 다양한 요리로 조리할 수 있으며 조리 후에도 생선근육 형태 모사 근육이 그대로 유지되어 실제 생선 요리와 매우 유사한 형태를 유지함을 확인할 수 있었다.

[84]

[85] 세포정렬 정도 측정 : 근육줄기세포 정렬 정도 측정

[86] 종래에 일반적으로 배양육 또는 배양생선을 제조하는 방법인 스케폴드를

이용하는 방법 대비 3차원 바이오프린팅 기술을 이용한 생선근육 형태 모사 근육을 포함하는 배양생선의 제조방법의 차이점을 확인하기 위해서 근육줄기세포 정렬 정도를 측정하였다.

- [87] 염침출법으로 제작된 스케폴드와 바이오프린팅으로 제작된 세포프린팅 구조체 내의 근육줄기세포 정렬 정도를 측정하기 위하여 28일간(4주) 배양된 스케폴드와 세포프린팅 구조체를 PBS로 세척하고 실온에서 20분간 4% 파라포름알데히드(4% paraformaldehyde, WAKO)에 담지하여 고정(fixation)하였다. 고정시킨 시료를 PBS로 3회 세척한 뒤 투과화 용액(0.02% Triton X-100, 2% BSA in PBS)을 실온에서 30분간 처리하였다. 이후 세포의 골격을 염색하기 위하여 팔로이딘(Phalloidin 488; Abcam, 1:400), 세포핵을 염색하기 위하여 다피(DAPI(6-diamidino-2-phenylindole, Sigma, 1:1000), 그리고 세포 액틴을 염색하기 위하여 WGA(Wheat gem agglutinin(647), Invitrogen, 1mg/ml)을 PBS에 희석하여 실온에서 1시간 동안 대조 염색시킨 뒤 형광현미경으로 형광 이미지를 획득하였다. 그 결과가 도 8에 예시되어 있다. 도 8에 예시되어 있는 바와 같이 스케폴드를 이용한 경우에는 근육줄기세포가 여러 방향으로 무작위로 배열되는 경향이 강한 것을 알 수 있다. 따라서, 스케폴드를 이용할 경우에는 불균일한 형태의 근육조직으로 최종 조직화될 수밖에 없음을 확인할 수 있다. 반면, 3차원 바이오프린팅 기술을 이용한 경우에는 근육줄기세포가 프린터 노즐로부터 토출된 방향으로 길쭉하게 정렬되어 있음을 확인할 수 있다. 따라서, 세포 분화 및 조직화가 일방향으로 일어나서 실제 생선근육에 가깝게 근육조직이 형성될 수 있도록 한다는 것을 확인할 수 있다.
- [88] 획득된 이미지로부터 Image-J (public domain) 프로그램을 이용하여 세포의 종횡비와 정렬정도를 산출한 결과가 도 9 및 도 10에 예시되어 있다. 도 9를 참조하면, 스케폴드(sponge)를 이용하는 경우 대비 바이오프린팅을 적용할 경우(CAP) 종횡비가 3배 이상 향상됨을 확인할 수 있다. 또한 도 10을 참조하면, 정렬 방향성을 반치전폭으로 계산하였으며, 스케폴드(sponge)를 이용하는 경우에는 반치전폭(°)이 61°인 반면 바이오프린팅의 경우에는 12°로 정렬 방향성이 현저하게 향상됨을 확인할 수 있다.

[89]

[90] 근육세포 분화도 측정

- [91] 염침출법으로 제작된 스케폴드와 바이오프린팅으로 제작된 세포프린팅 구조체 내의 근육세포의 분화도를 측정하기 위하여 28일간(4주) 배양된 스케폴드와 세포프린팅 구조체로부터 Myogenin, MyoD, MyHC의 mRNA 발현량을 측정하기 위해 real-time PCR(실시간 중합효소 연쇄반응)을 수행하였다.

- [92] 샘플로부터 각 세포를 수거하여 TRI 용액(Sigma-Aldrich)을 이용하여 total RNA를 분리하고 분광 광도계(INNO, LITECK)를 이용하여 순도를 측정하였다. 역전사 시스템을 이용하여 합성된 cDNA를 StepOne Plus RT-PCR 시스템(Applied

Biosystems)으로 측정하였다. 그 결과가 도 11에 예시되어 있다.

[93] 도 11의 결과로부터 Myogenin의 경우에는 스케폴드를 이용한 경우 대비 바이오프린팅을 적용할 경우(CAP) 4.9배가 Myod의 경우에는 스케폴드를 이용한 경우 대비 바이오프린팅을 적용할 경우(CAP) 3.7배가 MyHC의 경우에는 스케폴드를 이용한 경우 대비 바이오프린팅을 적용할 경우(CAP) 6.4배 정도 발현량이 증가하였음을 확인할 수 있다.

[94] 이로부터 세포프린팅에 의한 배양생선의 제조 방법을 적용시 근육세포의 분화가 훨씬 용이하게 진행되고 실제 생선의 근육형태를 모사하고 식감 또한 실제 생선과 유사한 배양생선을 제조할 수 있음을 확인할 수 있다.

[95]

[96] 식용 바이오잉크 조성에 따른 세포의 형태학적 변화 측정

[97] 식용 바이오잉크 조성에 따른 세포의 형태학적 변화를 측정하기 위해, 조피볼락에서 추출된 근원세포를 5×10^7 세포/mL의 농도로 다양한 바이오잉크와 물리적으로 혼합하였다. 바이오잉크에 혼합된 세포는 10 kPa의 공압으로 20 G의 노즐을 통하여 토출되어 4일간 배양되었다. 배양 1일차 및 4일차에 세포의 형태를 관찰하기 위하여 살아있는 세포의 막을 calcein AM(Invitrogen, USA)으로 형광염색하였고 죽은 세포의 핵을 Ethidium Homodimer-1(Invitrogen, USA)으로 형광염색하였다. 염색된 시료는 도립식 형광 현미경 (CKX53, OLYMPUS, Japan)을 이용하여 촬영하였다. 살아있는 세포의 막은 염색된 calcein AM에 의해 517 nm로 방출되어 초록색 형광 이미지로 취득되며 죽은 세포의 핵은 EthD-1에 의해 617 nm로 방출되어 빨간색 형광 이미지로 취득되었다.

[98] 도 12에 배양 1일차 및 배양 4일차에 측정한 형광 이미지들이 예시되어 있다. 도 12의 결과로부터 알지네이트 단독으로 사용하는 경우 대비 젤라틴을 추가하거나 젤라틴과 콜라겐을 모두 추가하는 경우 세포의 증식, 부착 및 이동성이 향상되어 세포가 훨씬 더 조직화가 잘 되는 것을 확인할 수 있다.

[99]

[100] W 패턴의 각도 및 선포에 따른 근육조직에 가해지는 압축강도 및 인장강도 측정

[101] 압축강도를 측정하기 위하여 식용 연어, 식용 넙치, 각도가 90도이고 선포이 각각 0.4 mm, 0.6 mm, 0.8 mm 인 W 패턴의 적층 구조체들을 15 x 15 mm의 크기로 잘라 제작하였다. 이후, 만능시험기(QM100S, QMESYS, Gunpo, Korea)를 이용하여 50 kgf의 힘과 10 mm/min 이송속도로 하중을 가하여 압축강도를 측정하였다. 변형율에 따른 압축강도는 제조사의 소프트웨어 Qm_Tester를 통하여 산출되었다.

[102] 인장강도를 측정하기 위하여 선포이 0.6 mm이고 각도가 각각 60도, 90도, 120도인 W 패턴의 적층 구조체들을 10 x 0.2 mm의 크기로 잘라 제작하였다. 이후, 만능시험기(QM100S, QMESYS, Gunpo, Korea)를 이용하여 50 kgf의 힘과

10 mm/min 이송속도로 시편을 연신하여 인장강도를 측정하였다. 변형율에 따른 인장강도는 제조사의 소프트웨어 Qm_Tester를 통하여 산출되었다.

- [103] 도 13에 W 형태의 각도 및 선폭을 달리하여 형성된 근육조직에 가해지는 압축강도 및 인장강도를 측정한 결과가 예시되어 있다. 도 13의 결과로부터 선폭이 커질수록 연어와 유사한 압축강도를 나타내고, W 패턴의 각도가 작을수록 인장강도가 커지는 것을 확인할 수 있다. 따라서, W 패턴의 각도는 20~70 도 범위에서 형성되는 것이 바람직함을 외삽을 통해서 구할 수 있다.

[104]

[105] 세포 농도에 따른 세포 정렬(조직화) 측정

- [106] 세포 농도에 따른 세포 정렬을 측정하기 위해서, 조피볼락에서 추출된 근원세포를 각각 5×10^7 세포/mL, 5×10^8 세포/mL의 농도로 알지네이트, 젤라틴, 콜라겐이 혼합된 바이오잉크와 물리적으로 혼합하였다. 바이오잉크에 혼합된 세포는 30 kPa의 공압으로 27 G의 노즐을 통하여 토출되어 7일간 배양되었다. 배양 3일차 및 7일차에 세포의 형태를 관찰하기 위하여 살아있는 세포의 막을 calcein AM(Invitrogen, USA)으로 형광염색하였고 죽은 세포의 핵을 Ethidium Homodimer-1(Invitrogen, USA)으로 형광염색하였다. 염색된 시료는 공초점 현미경 (FV 1200, OLYMPUS, Japan)을 이용하여 적층 촬영하였다. 살아있는 세포의 막은 염색된 calcein AM에 의해 517 nm로 방출되어 초록색 형광 이미지로 취득되며 죽은 세포의 핵은 EthD-1에 의해 617 nm로 방출되어 빨간색 형광 이미지로 취득되었다.

- [107] 도 14에 배양 3일차 및 배양 7일차에 측정한 형광 이미지들이 예시되어 있다. 도 14의 결과로부터 5×10^7 세포/mL 인 경우 대비 5×10^8 세포/mL의 경우 세포의 조직화가 더 잘 일어남을 알 수 있다. 도 14의 조직화 정도의 결과로부터 세포의 농도의 하한은 1×10^6 세포/mL 이고 상한은 1×10^{10} 세포/mL 정도가 적당함을 유추할 수 있다.

[108]

[109] 프린팅 공압에 따른 세포 정렬(조직화) 측정

- [110] 세포 농도에 따른 세포 정렬을 측정하기 위해서, 조피볼락에서 추출된 근원세포를 5×10^6 세포/mL의 농도로 알지네이트, 젤라틴, 콜라겐이 혼합된 바이오잉크와 물리적으로 혼합하였다. 바이오잉크에 혼합된 세포는 각각 10 kPa, 60 kPa의 공압으로 27 G의 노즐을 통하여 토출되어 7일간 배양되었다. 배양 3일차 및 7일차에 세포의 형태를 관찰하기 위하여 살아있는 세포의 막을 calcein AM(Invitrogen, USA)으로 형광염색하였고 죽은 세포의 핵을 Ethidium Homodimer-1(Invitrogen, USA)으로 형광염색하였다. 염색된 시료는 공초점 현미경 (FV 1200, OLYMPUS, Japan)을 이용하여 적층 촬영하였다. 살아있는 세포의 막은 염색된 calcein AM에 의해 517 nm로 방출되어 초록색 형광 이미지로 취득되며 죽은 세포의 핵은 EthD-1에 의해 617 nm로 방출되어 빨간색 형광 이미지로 취득되었다.

[111] 도 15에 배양 3일차 및 배양 7일차에 측정된 형광이미지들이 예시되어 있다. 도 15의 결과로부터 프린팅 공압이 세포의 정렬에 영향을 미치는 중요한 인자임을 확인할 수 있다.

[112]

[113] 이상에서 본 발명의 바람직한 실시예들에 대하여 상세하게 설명하였지만 본 발명의 권리 범위는 이에 한정되는 것은 아니고 다음의 청구 범위에서 정의하고 있는 본 발명의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본 발명의 권리 범위에 속하는 것이다.

산업상 이용가능성

[114] 식량 생산, 특히 배양 생선의 제조 및 배양 생선의 공급 분야에 적용 가능하다.

청구범위

- [청구항 1] 배양생선용 세포와 식용 바이오잉크를 혼합하여 세포 프린팅용 잉크를 준비하는 단계;
상기 세포 프린팅용 잉크를 생선근육 모사 패턴으로 프린팅하여 적층 구조체를 형성하는 단계;
상기 적층 구조체에 가교제를 첨가하는 단계; 및
상기 가교제가 첨가된 적층 구조체를 생선 근육 조직으로 배양하는 단계를 포함하는 배양 생선의 제조방법.
- [청구항 2] 제1 항에 있어서,
상기 적층 구조체를 생선 근육 조직으로 배양하는 단계는
상기 세포가 상기 바이오잉크 내에서 상기 프린팅시 토출된 방향으로 정렬되는 단계; 및
상기 정렬된 세포로부터 근육 조직이 형성되는 단계를 포함하는 3차원 바이오프린팅 기술을 이용한 생선근육 형태 모사 근육을 포함하는 배양생선의 제조방법.
- [청구항 3] 제1 항에 있어서,
상기 배양생선용 세포는 생선의 근육줄기세포 또는 생선의 근원세포인 배양생선의 제조방법.
- [청구항 4] 제1 항에 있어서,
상기 배양생선용 세포는 생선의 지방세포 또는 혈관내피세포를 더 포함하는 배양생선의 제조방법.
- [청구항 5] 제1 항에 있어서,
상기 배양생선용 세포는 상기 식용 바이오잉크에 1×10^6 세포/mL 내지 1×10^{10} 세포/mL의 농도로 혼합되는 배양생선의 제조방법.
- [청구항 6] 제1 항에 있어서,
상기 생선근육 모사 패턴은 W 패턴인 배양생선의 제조방법.
- [청구항 7] 제6 항에 있어서,
상기 적층 구조체는 생선근육 모사 패턴인 W패턴층과 상기 W패턴과 교차하는 라인 패턴층으로 이루어지는 배양생선의 제조방법.
- [청구항 8] 제7 항에 있어서,
상기 W 패턴층과 상기 라인패턴층은 교대로 적층되거나,
상기 W 패턴층을 2회 이상 반복하여 적층한 후 상기 라인 패턴층을 2회 이상 반복하여 적층하는 것을 교대로 하는 배양생선의 제조방법.
- [청구항 9] 제7 항에 있어서,
상기 W패턴층이 가장 하층에 위치하도록 프린팅하는 배양생선의 제조방법.
- [청구항 10] 제7 항에 있어서,

- 상하로 인접하는 상기 W 패턴층은 서로 오프-셋되어 배치되는 배양생선의 제조방법.
- [청구항 11] 제1 항에 있어서,
상기 프린팅시 노즐의 내경은 18G 내지 32G 혹은 1.00 mm 내지 0.10 mm이거나,
상기 프린팅 공압은 2kPa 내지 500 kPa인 배양생선의 제조방법.
- [청구항 12] 제1 항에 있어서
상기 배양생선 내에서 정렬된 상기 세포 핵의 종횡비는 2.0 내지 5.0 이거나,
상기 배양생선 내에서 정렬된 상기 세포의 골격 혹은 세포질의 종횡비는 3.0 내지 10.0인 배양생선의 제조방법.
- [청구항 13] 제1 항에 있어서
상기 배양생선 내에서 정렬된 세포의 반치전폭은 1° 내지 20°인 배양생선의 제조방법.
- [청구항 14] 제1 항에 있어서
상기 식용 바이오잉크는 알지네이트; 및
콜라겐, 젤라틴 및 키토산으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 물질을 포함하는 배양생선의 제조방법.
- [청구항 15] 생선근육 유래 세포를 포함하는 근육조직이 층층이(Layer by Layer) 적층된 배양생선.
- [청구항 16] 제15 항에 있어서,
상기 근육조직은 생선근육 형태 모사 W 패턴의 근육조직을 포함하는 배양생선.
- [청구항 17] 제16 항에 있어서,
상기 W 패턴의 근육조직과 교차하는 결합조직층을 더 포함하는 배양생선.
- [청구항 18] 제17 항에 있어서,
상기 배양생선의 가장 하층은 상기 W 패턴의 근육조직으로 이루어진 배양생선.
- [청구항 19] 제15 항에 있어서,
상기 배양생선 내에서 정렬된 상기 세포 핵의 종횡비는 2.0 내지 5.0 이거나,
상기 배양생선 내에서 정렬된 상기 세포의 골격 혹은 세포질의 종횡비는 3.0 내지 10.0인 배양생선.
- [청구항 20] 제15 항에 있어서,
상기 배양생선 내에서 정렬된 세포의 반치전폭은 1° 내지 20°인 배양생선.
- [청구항 21] 제15 항에 있어서,

상기 배양생선은 알지네이트; 및
콜라겐, 젤라틴 및 키토산으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의
물질을 포함하는 배양생선.

[청구항 22] 제15 항에 있어서,
생선지방 유래 세포 또는 생선 혈관 유래 세포를 더 포함하는 배양생선.