

명세서

발명의 명칭: 바이오 셀룰로오스를 포함하는 배양육 제조용 스캐폴드 및 이의 제조 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 바이오 셀룰로오스를 포함하는 배양육 제조용 스캐폴드 또는 바이오 셀룰로오스 분말을 포함하는 배양육 제조용 스캐폴드 및 이들의 제조 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 바이오 셀룰로오스 (bio-cellulose)는 미생물 배양을 통해 만들어지며, 대표적으로 리조비움 속 (*Rhizobium* sp.), 아그로박터 속 (*Agrobacter* sp.), 글루콘아세트박터 속 (*Gluconacetobacter* sp.) 및 아세트박터 속 (*Acetobacter* sp.)의 미생물이 과일을 이용한 배양액에서 균체 배양을 통해 생산하는 것으로 알려져 있다. 생산된 바이오 셀룰로오스는 화상처리제 같은 의약품이나 마스크팩 같은 화장품용으로 사용되고 있으며, 최근에는 포장 용기에 이용되는 등 이용 분야가 점점 넓어지고 있다. 바이오 셀룰로오스의 생산 효율이 가장 높은 균주로는 아세트박터 속 균주가 있으며, 아세트박터 균주를 정지배양의 방법으로 배양하는 경우, 배양액 상에 반투명 막의 형태로 바이오 셀룰로오스가 생성된다. 아세트박터 속 균주가 생산하는, 바이오 셀룰로오스는 글루코오스가 산소를 매개로 β -1,4 결합을 한 형태로 90% 이상 수분을 함유할 수 있으며, 3차원 망상 구조를 이룬다. 또한, 인체 내에서 분해되어 밖으로 배출되며, 인체에 무해한 것으로 알려져 있어 새로운 분야로의 연구가 활발히 진행 중이다.
- [3] 세포 외 기질 (Extracellular matrix; ECM)은 세포와 세포 사이에 위치하여 여러 세포들의 공간을 채우는 기질로, 대부분 다당류로 이루어진 겔과 단백질 섬유가 세포 사이에 채워져, 동물 조직의 구조적 지지와 형태의 유지 그리고 외부의 충격으로부터 보호되도록 물리적인 골격을 제공한다. 근육조직도 마찬가지로 근육세포들 사이에 세포 외 기질이 채워져 있어 근육조직의 형태와 구조를 유지하게 되며 나아가 물리적 특성을 갖는데 매우 중요한 역할을 하게 된다.
- [4] 오랜시간 동안 과학자들은 페트리 디쉬를 이용한 2차원 세포 배양법을 활용하여 다양한 연구를 수행해 왔다. 하지만, 2차원 세포 배양법으로 세포를 배양할 경우 실제 조직과는 다른 환경이 조성되는 문제가 있다. 3차원 세포 배양법으로 세포를 배양하기 위한 방법들이 연구되고 있으며 특히, 실제 조직과 유사하고 세포 부착이 가능한 세포 외 기질의 구조를 갖는 세포 부착 스캐폴드에 대한 중요성이 대두되고 있다. 생체 내 환경과 유사한 조직을 만들기 위한 스캐폴드는 조직공학 기술을 통하여 다양한 분야에 이용되고 있으며, 최근에는 세포를 배양하여 제조되는 배양육 분야에까지 활용되고 있다.
- [5] 배양육 제조에 이용할 수 있는 3차원 세포 배양 스캐폴드는 생체 적합성, 생체

안정성, 생체 기능성, 인체 무해성 등의 조건을 갖추어야 하며, 스캐폴드가 갖는 물리적 특성과 구조가 실제 고기의 구조와 유사해야 한다. 또한, 동물 보호 및 동물 복지를 고려할 때 비동물성 원료로 제작한 배양육용 스캐폴드에 대한 필요성이 대두되고 있다. 한편, 식물 및 해조류 유래 셀룰로오스는 많은 연구가 진행되어 다양한 분야에 이용되고 있으며, 최근 이를 이용하여 세포 부착 또는 배양이 가능한 스캐폴드에 대한 연구가 진행되고 있다. 그러나, 식물 및 해조류 유래 셀룰로오스는 조직 자체를 이용하기 때문에 스캐폴드 내부 구조를 조절하기 어려우며, 탈세포화 공정이 매우 복잡하여 배양육 제조용 스캐폴드로 사용하기에 한계가 있다.

- [6] 이에, 본 발명자들은 식물 및 해조류 유래 셀룰로오스가 아닌 미생물 유래 바이오 셀룰로오스를 기반으로 배양육 제조를 위한 스캐폴드를 제조하기 위하여 예의 노력한 결과, 미생물 유래 바이오 셀룰로오스를 기반으로 한 배양육 제조용 스캐폴드는 인체에 무해하고 섭취가 가능하며 세포 부착력이 뛰어나 실제 조직을 구현하기에 적합함을 확인하였고, 더 나아가 미생물 유래 바이오 셀룰로오스를 분말화한 후 첨가함으로써 바이오 셀룰로오스 자체의 물성을 제어할 수 있고, 부피가 큰 바이오 셀룰로오스를 생산하는데 많은 시간이 소요되는 문제를 해결할 수 있는 배양육 제조용 스캐폴드를 생산함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명의 목적은 미생물 유래 바이오 셀룰로오스를 포함하는 배양육 제조용 스캐폴드를 제공하는 것이다.
- [8] 본 발명의 다른 목적은 상기 배양육 제조용 스캐폴드의 제조 방법을 제공하는 것이다.
- [9] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 제조방법으로 제조된 배양육 제조용 스캐폴드에 비-인간 동물 유래 세포를 배양하여 제조되는 배양육을 제공하는 것이다.
- [10] 본 발명의 또 다른 목적은 미생물 유래 바이오 셀룰로오스 분말, 천연 고분자 겔화제 및 겔화 촉진제를 포함하는 배양육 스캐폴드 제조용 조성물을 제공하는 것이다.
- [11] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물로부터 제조된 배양육 스캐폴드를 제공하는 것이다.
- [12] 본 발명의 또 다른 목적은 (a) 펍톤을 포함하는 배지에서 미생물을 정치 배양하여 바이오 셀룰로오스를 수득하는 단계; (b) 상기 단계 (a)에서 수득한 바이오 셀룰로오스를 증류수로 세척하고 건조하는 단계; (c) 상기 건조된 바이오 셀룰로오스를 동결시킨 후, 10,000 내지 15,000 rpm으로 분쇄하여 미생물 유래 바이오 셀룰로오스 분말을 수득하는 단계; (d) 상기 미생물 유래 바이오

셀룰로오스 분말을 천연 고분자 겔화제와 혼합하는 단계; 및 (e) 상기 (d)의 결과물을 동결건조한 후 겔화 촉진제를 첨가하는 단계를 포함하는 배양육 스캐폴드의 제조 방법을 제공하는 것이다.

- [13] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 방법으로 제조된 배양육 스캐폴드에 비-인간 동물 유래 세포를 배양하여 제조되는 배양육을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [14] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 첨부되는 도면과 함께 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나, 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 제한되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있으며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 기술자에게 본 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.
- [15] 본 명세서에서 사용된 용어는 실시예들을 설명하기 위한 것이며 본 발명을 제한하고자 하는 것은 아니다. 본 명세서에서, 단수형은 문구에서 특별히 언급하지 않는 한 복수형도 포함한다. 명세서에서 사용되는 "포함한다 (comprises)" 및/또는 "포함하는 (comprising)"은 언급된 구성요소 외에 하나 이상의 다른 구성요소의 존재 또는 추가를 배제하지 않는다. 명세서 전체에 걸쳐 동일한 도면 부호는 동일한 구성 요소를 지칭하며, "및/또는"은 언급된 구성요소들의 각각 및 하나 이상의 모든 조합을 포함한다. 비록 "제1", "제2" 등이 다양한 구성요소들을 서술하기 위해서 사용되나, 이들 구성요소들은 이들 용어에 의해 제한되지 않음은 물론이다. 이들 용어들은 단지 하나의 구성요소를 다른 구성요소와 구별하기 위하여 사용하는 것이다. 따라서 이하에서 언급되는 제1 구성요소는 본 발명의 기술적 사상 내에서 제2 구성요소일 수도 있음은 물론이다.
- [16] 다른 정의가 없다면, 본 명세서에서 사용되는 모든 용어 (기술 및 과학적 용어를 포함)는 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 기술자에게 공통적으로 이해될 수 있는 의미로 사용될 수 있을 것이다. 또한, 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 용어들은 명백하게 특별히 정의되어 있지 않는 한 이상적으로 또는 과도하게 해석되지 않는다.
- [17] 본 발명은 미생물 유래 바이오 셀룰로오스를 포함하는 배양육 제조용 스캐폴드를 제공한다.
- [18] 본 발명의 배양육은 클린육 (clean meat) 또는 세포 기반 육 (cell-based meat) 또는 재배육 (cultivated meat)이라고도 하며, 인간 또는 비-인간 동물이 먹기에 적합하거나 식용가능한 것을 의미한다.
- [19] 본 발명의 스캐폴드는 미생물 유래 바이오 셀룰로오스를 기반으로 한 스캐폴드로, 고기의 구조와 유사하며 세포 부착능을 갖는 배양육 제조용

스캐폴드이다. 보다 구체적으로, 상기 미생물 유래 바이오 셀룰로오스를 기반으로 한 스캐폴드는 우수한 세포 부착능을 가지며, 닭, 소고기 또는 돼지고기와 유사한 구조를 가질 수 있는 배양육 제조용 스캐폴드이다.

- [20] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 미생물은 아세트박터 속 (*Acetobacter* sp.), 글루콘아세트박터 속 (*Gluconacetobacter* sp.), 리조비움 속 (*Rhizobium* sp.) 및 아그로박터 속 (*Agrobacter* sp.) 미생물로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상이고, 바람직하게는 생산 수율이 좋은 아세트박터 속 (*Acetobacter* sp.) 또는 글루콘아세트박터 속 (*Gluconacetobacter* sp.)일 수 있다.
- [21] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 미생물 유래 바이오 셀룰로오스는 동물성 펩톤, 박테리아 펩톤 또는 식물성 펩톤을 포함하는 액체 배지에서 생성될 수 있다.
- [22] 상기 동물성 펩톤은 미트 (meat) 및/또는 카제인 (casein)일 수 있다.
- [23] 상기 박테리아 펩톤은 박토 펩톤 (Bacto peptone)일 수 있다.
- [24] 상기 식물성 펩톤은 대두 펩톤 (soy peptone), 밀 펩톤 (wheat peptone), 잠두 펩톤 (broadbean peptone), 감자 펩톤 (potato peptone), 완두콩 펩톤 (pea peptone), 파파이크 대두 펩톤 (papaic soy peptone) 및 루핀 펩톤 (lupin peptone)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상이고, 바람직하게는 대두 펩톤일 수 있다.
- [25] 상기 식물성 펩톤은 식물로부터 유래된 단백질을 산처리, 염기처리, 효소처리, 열처리 또는 고압처리에 의해 분해시킨 산물일 수 있다.
- [26] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 미생물 유래 바이오 셀룰로오스는 글루코오스, 프룩토오스 또는 이들의 조합을 탄소원으로 포함하는 액체 배지에서 생성될 수 있다.
- [27] 미생물 유래 바이오 셀룰로오스를 생산하는 균주들은 성장하는 동안 통상 글루코오스 (glucose), 수크로오스 (sucrose), 당 밀 (molasses), 프룩토오스 (fructose), 만니톨 (mannitol) 및 글리세롤 (glycerol) 등을 탄소원으로 사용하고, 감즙 및 감식초, 사과즙, 포도즙, 맥주폐액 및 코코넛 부산물 등을 보조 탄소원으로 사용하며, 카제인 (casein), 펩톤 (peptone), 효모 추출물 (yeast extract) 등을 질소원으로 사용하지만, 균주에 따라 최적의 탄소원과 보조 탄소원, 질소원이 각각 다르다.
- [28] 다양한 종류의 탄소원과 보조 탄소원 그리고 질소원 중 최적의 것을 선택하여 적정 농도의 배양조건을 확립하는 것은 비용적 측면에서 중요할 뿐만 아니라 영양분의 부족으로 인한 수율 저하 억제, 과도한 탄소원의 소비로 촉발되는 부산물의 축적 저해 등을 통해 수율 향상 효과를 낼 수 있기 때문에 중요하다.
- [29] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서, 상기 바이오 셀룰로오스는 글루코오스 및 프룩토오스를 포함하는 액체 배지에서 생성될 수 있다.
- [30] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서, 상기 바이오 셀룰로오스는 글루코오스 함량이 증가될수록 세밀한 구조를 가지며, 프룩토오스 함량이 증가될수록 느슨한 구조를 가지는 것을 특징으로 하는 배양육 제조용 스캐폴드를 제공한다.

상기 바이오 셀룰로오스는 글루코오스 및 프룩토오스를 5:1 내지 1:5의 조합으로 포함하는 액체 배지에서 생성되는 것일 수 있다.

- [31] 본 발명에서도 박테리아 셀룰로오스의 생성능이 확인된 *Gluconacetobacter xylinus* subsp. *xylinus* (KCCM41431) 균주를 이용하여 미생물 유래 바이오 셀룰로오스를 생성할 때, 배양육 제조용 스캐폴드로서의 물리적 특성을 갖도록 글루코오스 및 프룩토오스의 단독 또는 혼합비 등의 최적의 탄소원에 대한 배양 조건을 연구하여 본 발명의 배양육 제조용 스캐폴드를 설계하였다.
- [32] 또한, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 배양육 제조용 스캐폴드의 제조 방법을 제공한다: (a) 펩톤을 포함하는 액체 배지에 미생물을 투입하고 28 내지 32 °C에서 정지배양하여 바이오 셀룰로오스를 수득하는 단계; 및 (b) 상기 단계 (a)에서 수득한 바이오 셀룰로오스를 증류수로 세척하고 염기성 용액에서 끓인 후 증류수로 세척하여 하이드로겔 형태의 바이오 셀룰로오스 스캐폴드를 제조하는 단계.
- [33] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 제조 방법에서, 단계 (a)의 액체 배지는 글루코오스, 프룩토오스 또는 이들의 조합을 탄소원으로 포함할 수 있다.
- [34] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 제조 방법에서, 단계 (b)의 하이드로겔 형태의 바이오 셀룰로오스 스캐폴드를 동결건조하여 동결건조 형태의 바이오 셀룰로오스 스캐폴드를 제조하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [35] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 제조 방법에서, 미생물은 아세트박터 속 (*Acetobacter* sp.), 글루콘아세트박터 속 (*Gluconacetobacter* sp.), 리조비움 속 (*Rhizobium* sp.) 및 아그로박터 속 (*Agrobacter* sp.) 미생물로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다.
- [36] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 제조 방법에서, 펩톤은 동물성 펩톤, 박테리아 펩톤 또는 식물성 펩톤일 수 있다.
- [37] 상기 동물성 펩톤은 미트 및/또는 카제인일 수 있다.
- [38] 상기 박테리아 펩톤은 박토 펩톤일 수 있다.
- [39] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 제조 방법에서, 식물성 펩톤은 대두 펩톤 (soy peptone), 밀 펩톤 (wheat peptone), 참두 펩톤 (broadbean peptone), 감자 펩톤 (potato peptone), 완두콩 펩톤 (pea peptone), 파파익 대두 펩톤 (papaic soy peptone) 및 루핀 펩톤 (lupin peptone)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다.
- [40] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 제조 방법에서, 식물성 펩톤은 식물로부터 유래된 단백질을 산처리, 염기처리, 효소처리, 열처리 또는 고압처리에 의해 분해시킨 산물일 수 있다.
- [41] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 제조된 배양육 제조용 스캐폴드에 비-인간 동물 유래 세포를 배양하여 제조되는 배양육을 제공한다.
- [42] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 비-인간 동물 유래 세포는 근줄기세포, 근육 세포 및 이의 전구세포 (progenitor)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종

이상일 수 있다.

- [43] 상기 근줄기세포는 위성 세포 (satellite cell) 또는 근아세포 (myoblast), 예를 들어 근아세포일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [44] 상기 근육세포는 근세포 (myocyte) 또는 근관세포 (myotube), 예를 들어, 근세포일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [45] 상기 전구세포는 복수 계통으로 분화된 세포를 생성시킬 수 있는 세포, 예컨대 근아세포, 섬유아세포, 지방세포, 간질 세포, 주피세포, 평활근 세포 및 내피 세포를 지칭한다. 전구세포는 이들이 전형적으로 광범위한 자기 복제 능력을 갖지 않는다는 점에서 줄기 세포와는 상이하다.
- [46] 상기 비-인간 동물 유래 세포는 지방 세포 (fat cell 또는 adipocyte) 및/또는 이의 전구 세포, 간질 세포 (결합 조직) 및/또는 이의 전구 세포, 또는 내피 세포 (혈관) 및/또는 이의 전구 세포를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [47] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 비-인간 동물은 소, 양, 돼지, 가금류, 갑각류 및 어류로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [48] 또한, 본 발명은 미생물 유래 바이오 셀룰로오스 분말, 천연 고분자 겔화제 및 겔화 촉진제를 포함하는 배양육 스캐폴드 제조용 조성물을 제공한다.
- [49] 본 발명의 미생물은 리조비움 속 (*Rhizobium* sp.), 아그로박터 속 (*Agrobacter* sp.), 글루콘아세트박터 속 (*Gluconacetobacter* sp.) 및 아세트박터 속 (*Acetobacter* sp.) 미생물로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다. 바람직하게는 생산 수율이 좋은 아세트박터 속 (*Acetobacter* sp.) 또는 글루콘아세트박터 속 (*Gluconacetobacter* sp.)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [50] 본 발명의 배양육은 클린육 (clean meat) 또는 세포 기반 육 (cell-based meat) 또는 재배육 (cultivated meat)이라고도 하며, 인간 또는 비-인간 동물이 먹기에 적합하거나 식용가능한 것을 의미한다.
- [51] 본 발명의 스캐폴드는 미생물 유래 바이오 셀룰로오스 분말, 천연 고분자 겔화제 및 겔화 촉진제를 기반으로 한 스캐폴드 조성물로 제조된, 고기의 구조와 유사하며 세포 부착능을 가지는 배양육 제조용 스캐폴드이다.
- [52] 본 발명의 바이오 셀룰로오스는 동물성 펩톤, 박테리아 펩톤 또는 식물성 펩톤을 포함하는 배지에서 생성될 수 있으며, 바람직하게는 식물성 펩톤일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [53] 상기 동물성 펩톤은 미트 (meat) 또는 카제인 (casein)일 수 있다.
- [54] 상기 박테리아 펩톤은 박토 펩톤 (Bacto peptone)일 수 있다.
- [55] 상기 식물성 펩톤은 대두 펩톤 (soy peptone), 밀 펩톤 (wheat peptone), 잠두 펩톤 (broadbean peptone), 감자 펩톤 (potato peptone), 완두콩 펩톤 (pea peptone), 파파익 대두 펩톤 (papaic soy peptone) 및 루핀 펩톤 (lupin peptone)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으며, 바람직하게는 대두 펩톤일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [56] 본 발명의 미생물 유래 바이오 셀룰로오스를 생산하는 균주들은 생장하는 동안 글루코오스 (glucose), 수크로오스 (sucrose), 당 밀 (molasses), 프룩토오스 (fructose), 만니톨 (mannitol) 및 글리세롤 (glycerol) 등을 탄소원으로 사용할 수 있고, 감즙 및 감식초, 사과즙, 포도즙, 맥주폐액 및 코코넛 부산물 등을 보조 탄소원으로 사용하며, 카제인 (casein), 펩톤 (peptone), 효모 추출물 (yeast extract) 등을 질소원으로 사용하지만, 균주에 따라 최적의 탄소원과 보조 탄소원, 질소원이 각각 다르다.
- [57] 다양한 종류의 탄소원과 보조 탄소원 그리고 질소원 중 최적의 것을 선택하여 적정 농도의 배양 조건을 확립하는 것은 비용적 측면에서 중요할 뿐만 아니라 영양분의 부족으로 인한 수율 저하 억제, 과도한 탄소원의 소비로 촉발되는 부산물의 축적 저해 등을 통해 수율 향상 효과를 낼 수 있기 때문에 중요하다.
- [58] 본 발명에서는 박테리아 셀룰로오스의 생성능이 확인된 글루콘아세토박터 자일리누스 아종 자일리누스 (*Gluconacetobacter Xylinus* subsp. *Xylinus*) 균주 (기탁번호: KCCM41431) 균주를 이용하여 미생물 유래 바이오 셀룰로오스를 생성할 때, 배양육 제조용 스캐폴드로서의 물리적 특성을 갖도록 글루코오스의 탄소원에 대한 배양 조건을 연구하여 본 발명의 배양육 스캐폴드 제조용 조성물을 설계하였다.
- [59] 본 발명의 천연 고분자 겔화제 (하이드로겔 원료)는 알지네이트 (Alginate), 아가 (Agar) 및 카라기난 (carrageenan)으로 이루어진 균으로부터 선택되는 어느 하나를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [60] 본 발명의 알지네이트는 미역, 다시마 등의 갈조류에서 추출되는 끈끈한 점액질 성분으로, 물에는 용해되지 않고 팽윤하며 콜로이드 즉, 미립자가 기체나 액체 속에 응집 또는 분사되어 있는 상태의 복합 다당류이다. 점증제, 유화안정제, 겔화제 등의 여러가지 용도로 사용되며, 식품, 산업, 의료 등 다양한 분야에 응용될 수 있다. 자연 상태에서는 나트륨, 칼슘, 칼륨 등과 결합하여 존재하며 화장품에 포함 시 흡착성이 우수하여 독소 제거에 효과적이며 보습력이 우수한 특성이 있다. Ca^{2+} 등의 다가 금속을 첨가하고 알지네이트를 가교하여 하이드로겔을 제작할 경우 실제 생물체의 조직을 모사할 수 있다.
- [61] 본 발명의 아가 (한천)는 해조류인 우뚝가사리에서 추출된 것으로 우뚝가사리의 점장을 동결 건조한 물질로 갈락토오스가 주성분이고 젤라틴과 유사한 물리적인 성질을 가진 투명한 물질이다. 물에 녹여서 식용으로 사용하기도 하고, 공업용 재료로 사용하기도 한다. 물에 잘 용해되고, 투명하며 말랑말랑한 물질이다. 미생물이나 식물조직, 동물세포를 고정해서 배양하는 고정배지의 조제용으로 사용하기도 한다. 저열량, 고 식이섬유 소재로 지방 및 단백질 대체제로서 가능성이 높다.
- [62] 본 발명의 카라기난은 홍조류에서 추출한 물질로 주성분은 갈락토오스이고, 식품에서 겔화제, 증점제로 많이 사용되며, 의약품이나 화장품의 안정화제, 분산제로서 널리 사용되고 있다. 70 내지 80 °C 이상의 물에서 완전히 용해되는

특성을 가진다. 상기 카라기난은 무미 무취의 연한 아이보리색 분말로, 카라기난이 용해된 수용액은 상온에서 점성이 있는 용액이 되거나 겔 (gel)을 형성한다. 보수력이 우수하여 시간이 지나도 점도가 변화하지 않는다.

- [63] 본 발명의 겔화 촉진제는 1축 또는 2축 금속염일 수 있다. 상기 겔화 촉진제는 염화칼륨, 염화칼슘, 염화마그네슘 및 젖산칼슘으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 금속염일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [64] 본 발명의 미생물 유래 바이오 셀룰로오스 분말은 상기 미생물 유래 바이오 셀룰로오스를 동결시킨 후, 10,000 내지 15,000 rpm으로 분쇄한 후 구경 0.5 내지 2 mm의 체반으로 분리된 것일 수 있다.
- [65] 본 발명의 배양육 스캐폴드 제조용 조성물은 배양육 제조용 조성물 100 중량부에 대하여, 상기 미생물 유래 바이오 셀룰로오스 분말은 1 내지 20 중량부, 바람직하게는 1 내지 10 중량부를 포함할 수 있고, 상기 천연 고분자 겔화제는 1 내지 5 중량부, 바람직하게는 1 내지 2 중량부를 포함할 수 있고, 상기 겔화 촉진제는 1 내지 5 중량부, 바람직하게는 1 내지 2 중량부를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [66] 본 발명의 미생물 유래 바이오 셀룰로오스 분말은 배양육 제조용 조성물 100 중량부에 대하여, 1 중량부 미만인 경우 하이드로겔 자체의 강도가 매우 약하고 배양 가능한 세포의 양에 제한이 있다. 또한, 20 중량부 초과인 경우 셀룰로오스 분말이 하이드로겔 원료의 가교를 방해하여 하이드로겔의 형태를 유지하기 매우 어렵다.
- [67] 상기 천연 고분자 겔화제는 배양육 제조용 조성물 100 중량부에 대하여, 1 중량부 미만인 경우 가교에 필요한 성분이 부족하여 하이드로겔의 형태의 유지가 어려우며, 5 중량부 초과인 경우 매우 단단한 하이드로겔이 형성되고 하이드로겔 기공 (pore)의 크기가 감소하여 수분 흡수량이 적어져, 세포 배양에 어려움을 갖는다.
- [68] 또한, 본 발명은 상기 배양육 스캐폴드 제조용 조성물로부터 제조된 배양육 스캐폴드를 제공한다.
- [69] 상기 배양육 스캐폴드는 미생물 유래 바이오 셀룰로오스 분말 및 천연 고분자 겔화제를 포함할 수 있다.
- [70] 본 발명의 배양육 스캐폴드는 상기 조성물 내 바이오 셀룰로오스 분말의 농도가 증가함에 따라 상기 배양육 스캐폴드의 경도, 감성 및 씹힘성이 증가할 수 있다.
- [71] 또한, 상기 조성물 내 바이오 셀룰로오스 분말의 농도가 증가함에 따라 상기 배양육 스캐폴드의 탄력성, 응집성 및 탄성은 감소할 수 있다.
- [72] 또한, 본 발명은 상기 배양육 스캐폴드의 제조방법을 제공한다.
- [73] 상기 배양육 스캐폴드의 제조방법은 하기 단계를 포함할 수 있다: (a) 펩톤을 포함하는 배지에서 미생물을 정치 배양하여 바이오 셀룰로오스를 수득하는 단계; (b) 상기 단계 (a)에서 수득한 바이오 셀룰로오스를 증류수로 세척하고

- 건조하는 단계; (c) 상기 건조된 바이오 셀룰로오스를 동결시킨 후, 10,000 내지 15,000 rpm으로 분쇄하여 미생물 유래 바이오 셀룰로오스 분말을 수득하는 단계; (d) 상기 미생물 유래 바이오 셀룰로오스 분말을 천연 고분자 겔화제와 혼합하는 단계; 및 (e) 상기 (d)의 결과물을 동결건조한 후 겔화 촉진제를 첨가하는 단계.
- [74] 상기 펩톤은 대두 펩톤 (soy peptone), 밀 펩톤 (wheat peptone), 완두콩 펩톤 (broadbean peptone), 감자 펩톤 (potato peptone), 완두콩 펩톤 (pea peptone), 파파이크 대두 펩톤 (papaic soy peptone) 및 루핀 펩톤 (lupin peptone)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [75] 상기 미생물은 리조비움 속 (*Rhizobium* sp.), 아그로박터 속 (*Agrobacter* sp.), 글루콘아세트박터 속 (*Gluconacetobacter* sp.) 및 아세트박터 속 (*Acetobacter* sp.) 미생물로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있고, 바람직하게는 아세트박터 속 (*Acetobacter* sp.) 또는 글루콘아세트박터 속 (*Gluconacetobacter* sp.)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [76] 상기 천연 고분자 겔화제는 알지네이트 (Alginate), 아가 (Agar) 및 카라기난 (carrageenan)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [77] 상기 겔화 촉진제는 염화칼륨, 염화칼슘, 염화마그네슘 및 젖산칼슘으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 금속염일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [78] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 제조된 배양육 스캐폴드에 비-인간 동물 유래 세포를 배양하여 제조되는 배양육을 제공한다.
- [79] 상기 비-인간 동물 유래 세포는 근줄기세포, 근육 세포 및 이의 전구세포 (progenitor)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다.
- [80] 상기 근줄기세포는 위성 세포 (satellite cell) 또는 근아세포 (myoblast), 예를 들어, 근아세포일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [81] 상기 근육세포는 근세포 (myocyte) 또는 근관세포 (myotube), 예를 들어, 근세포일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [82] 상기 전구세포는 복수 계통으로 분화된 세포를 생성시킬 수 있는 세포, 예를 들어, 근아세포, 섬유아세포, 지방세포, 간질 세포, 주피세포, 평활근 세포 및 내피 세포를 지칭한다. 전구세포는 이들이 전형적으로 광범위한 자기 복제 능력을 가지지 않는다는 점에서 줄기세포와는 상이하다.
- [83] 상기 비-인간 동물 유래 세포는 지방 세포 (fat cell 또는 adipocyte) 및/또는 이의 전구세포, 간질 세포 (결합 조직) 및/또는 이의 전구세포, 또는 내피 세포 (혈관) 및/또는 이의 전구세포를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [84] 본 발명의 비-인간 동물은 소, 양, 돼지, 가금류, 갑각류 및 어류로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

발명의 효과

- [85] 본 발명은 미생물 유래 바이오 셀룰로오스를 기반으로 한 스캐폴드를 제공하고, 미생물 유래 바이오 셀룰로오스를 분말화하여 기존의 하이드로겔 제작에 사용되는 원료와 혼합하여 제조된 새로운 하이드로겔을 제공하며, 우수한 세포부착능 및 물리적 특성으로 인해 배양용 제조용 스캐폴드로 유용하게 사용될 수 있다.
- 도면의 간단한 설명**
- [86] 도 1은 아세토박터 액체 배지 100 중량부에 대하여 2 중량부의 글루코오스를 포함하는 액체 배지에서 제조된 하이드로겔 형태 또는 하이드로겔을 동결건조하여 제조된 동결건조 형태의 바이오 셀룰로오스 스캐폴드를 나타낸 도이다.
- [87] 도 2는 아세토박터 액체 배지 100 중량부에 대하여 2 중량부의 글루코오스 또는 프룩토오스를 포함하는 액체 배지에서 제조된 하이드로겔 바이오 셀룰로오스 스캐폴드를 동결건조하여 이의 단면을 주사전자현미경 (Scanning Electron Microscope; SEM)으로 관찰한 이미지를 나타낸 도이다.
- [88] 도 3은 아세토박터 액체 배지 100 중량부에 대하여 2 중량부의 글루코오스 또는 프룩토오스를 포함하는 액체 배지에서 제조된 하이드로겔 형태의 바이오 셀룰로오스 스캐폴드에서의 근줄기세포의 부착성을 형광현미경으로 관찰한 이미지를 나타낸 도이다.
- [89] 도 4는 아세토박터 액체 배지 100 중량부에 대하여 2 중량부의 탄소원을 포함하되, 탄소원으로 글루코오스와 프룩토오스의 혼합비율 (5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5)을 달리하여 포함된 액체 배지에서 제조된 하이드로겔 형태의 바이오 셀룰로오스 스캐폴드를 동결건조하여 단면을 SEM으로 관찰한 이미지를 나타낸 도이다.
- [90] 도 5는 아세토박터 액체 배지 100 중량부에 대하여 2 중량부의 탄소원을 포함하되, 탄소원으로 글루코오스와 프룩토오스의 혼합비율 (5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5)을 달리하여 포함된 액체 배지에서 제조된 하이드로겔 형태의 바이오 셀룰로오스 스캐폴드에서의 근줄기세포의 부착성을 형광현미경으로 관찰한 이미지를 나타낸 도이다.
- [91] 도 6은 바이오 셀룰로오스를 3차 분쇄하는 방법을 나타낸 모식도이다.
- [92] 도 7은 분말화한 바이오 셀룰로오스와 알지네이트, 아가 또는 카라기난을 혼합하여 제조한 배양용 스캐폴드를 나타낸 도이다.
- [93] 도 8a는 알지네이트로 제작된 스캐폴드 및 알지네이트에 바이오 셀룰로오스 분말을 첨가한 스캐폴드에서 근줄기세포의 부착 및 배양을 확인한 도이고, 도 8b는 아가로 제작된 스캐폴드 및 아가에 바이오 셀룰로오스 분말을 첨가한 스캐폴드에서 근줄기세포의 부착 및 배양을 확인한 도이고, 도 8c는 카라기난으로 제작된 스캐폴드 및 카라기난에 바이오 셀룰로오스 분말을 첨가한 스캐폴드에서 근줄기세포의 부착 및 배양을 확인한 도이다.

- [94] 도 9는 전체 면적 대비 형광 염색 비율을 통해 세포 배양능을 추적한 결과를 나타낸 도이다.
- [95] 도 10은 알지네이트, 아가 또는 카라기난을 포함한 스캐폴드의 단면 및 알지네이트, 아가 또는 카라기난과 바이오 셀룰로오스 분말이 혼합된 스캐폴드의 단면을 분석한 결과를 나타낸 도이다.
- [96] 도 11은 조성물 전체 100 중량부에 대하여 바이오 셀룰로오스 분말 0, 1, 5, 10 중량부, 알지네이트, 아가 또는 카라기난 2 중량부와 혼합하여 혼합 스캐폴드를 제작한 것을 나타낸 도이다.
- [97] 도 12는 닭, 소, 돼지고기의 경도 (Hardness), 검성 (Gumminess), 씹힘성 (Chewiness), 탄력성 (Springiness), 응집성 (Cohesiveness) 및 탄성 (Resilience)의 결과와 바이오 셀룰로오스 혼합 하이드로겔 스캐폴드의 바이오 셀룰로오스 분말 농도 의존적으로 경도 (Hardness), 검성 (Gumminess), 씹힘성 (Chewiness), 탄력성 (Springiness), 응집성 (Cohesiveness) 및 탄성 (Resilience)의 변화를 나타낸 도이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [98] 이하, 본 발명의 내용을 하기의 실시예 및 실험예를 통해 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예 및 실험예에만 한정되는 것은 아니고, 이와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.
- [99] 실시예 1. 미생물 유래 바이오 셀룰로오스 스캐폴드 제조
- [100] 바이오 셀룰로오스 스캐폴드 제조를 위해 본 발명의 글루콘아세트박터 속 균주로 글루콘아세트박터 자일리누스 아종 자일리누스 (*Gluconacetobacter Xylinus* subsp. *Xylinus*) 균주 (기탁번호 : KCCM41431)를 생균 형태로 (사)한국미생물보존센터로부터 분양받아 사용하였다. -80 °C에서 보관중인 상기 균주를 글루콘아세트박터 고체 배지 (0.5% 효모 추출물 (yeast extract), 0.5% 대두 펩톤, 2% 글루코오스, 0.27% 인산이나트륨 (disodium phosphate), 0.15% 구연산 (citric acid) 및 2% 한천 (agar) 포함)에 도말하여 30 °C에서 48시간 동안 배양하였다. 상기 고체 배지에서 배양된 본 발명의 글루콘아세트박터 속 균주를 글루콘아세트박터 액체 배지 (0.5% 효모 추출물 (yeast extract), 0.5% 대두 펩톤, 2% 글루코오스, 0.27% 인산이나트륨 (disodium phosphate) 및 0.15% 구연산 (citric acid) 포함)에 접종하여 72시간 이상 정치 배양하여 바이오 셀룰로오스를 수득하였다. 수득한 바이오 셀룰로오스를 하이드로겔화하기 위하여, 바이오 셀룰로오스에 포함되어 있는 배지를 증류수로 세척하고, 남아있는 미생물을 제거하기 위하여 0.1 M NaOH 용액에서 1시간 끓인 후, NaOH 용액을 제거하기 위하여 증류수로 3회 세척한 후 하이드로겔 형태의 바이오 셀룰로오스 스캐폴드를 30% 에탄올에 보관하였다. 보관중인 바이오 셀룰로오스 스캐폴드를 증류수로 세척한 후, 고압증기멸균을 통해 멸균하였다. 멸균된 바이오 셀룰로오스 스캐폴드를 PBS로 3번 세척하여 상기 하이드로겔 형태의 바이오 셀룰로오스

스캐폴드와 이를 동결건조한 동 결건조 형태의 바이오 셀룰로오스 스캐폴드를 제조하였다 (도 1). 상기와 동일한 조건으로 대두 펩톤 대신 미트 (meat) 펩톤을 사용하여 바이오 셀룰로오스 스캐폴드를 제조하였다.

- [101] 실시예 2. 탄소원의 종류에 따른 바이오 셀룰로오스 스캐폴드의 비교
- [102] 2-1. 탄소원의 종류에 따른 바이오 셀룰로오스 스캐폴드의 단면 분석
- [103] 상기 아세트박터 액체 배지 100 중량부에 대하여 2 중량부의 탄소원을 포함하되, 상기 탄소원으로 글루코오스 또는 프룩토오스를 달리 포함하는 액체 배지에서 제조된 하이드로겔 형태의 바이오 셀룰로오스 스캐폴드의 단면을 관찰하기 위하여 하이드로겔 형태의 바이오 셀룰로오스 스캐폴드를 -80 °C에서 24시간 동안 선 동결 후 48시간 동결건조하였다. 동결건조된 바이오 셀룰로오스 스캐폴드는 20 mA에서 60초 동안 백금 코팅 1회 하였으며, 코팅된 바이오 셀룰로오스 스캐폴드의 단면을 SEM을 통하여 관찰하였다 (도 2).
- [104] 그 결과, 미트 (meat) 펩톤 그리고 글루코오스를 탄소원으로 사용하여 생산된 바이오 셀룰로오스 스캐폴드의 단면은 단단한 층으로 이루어진 고기의 결과 유사한 형태를 띄고 있으며, 세밀한 층을 여러 겹으로 이루고 있어 매우 질기고 단단한 구조를 형성하는 것을 확인하였다. 대두 펩톤과 글루코오스를 이용하여 생산한 바이오 셀룰로오스는 미트 펩톤과 글루코오스를 이용하여 생산한 바이오 셀룰로오스와 마찬가지로 동일한 구조의 바이오 셀룰로오스를 생산한다는 것을 확인하였다. 이에 비해 프룩토오스를 탄소원으로 사용하여 생산된 바이오 셀룰로오스 스캐폴드의 단면은 세밀하지 않은 스폰지와 유사한 구조로 인해 단단한 층을 형성하지 않아, 글루코오스를 탄소원으로 사용하여 생산된 바이오 셀룰로오스 스캐폴드에 비해 상대적으로 질기지 않으며 단단하지 않다는 것을 확인하였다.
- [105] 상기 바이오 셀룰로오스 스캐폴드 모두 고기의 결과 유사한 형태의 구조를 갖고 있어서, 근육세포를 본 발명의 바이오 셀룰로오스 스캐폴드에 부착할 경우 고기의 구조와 유사한 배양육을 제조할 수 있음을 예측하였다.
- [106] 2-2. 탄소원의 종류에 따른 바이오 셀룰로오스 스캐폴드의 세포 부착성 분석
- [107] 상기 탄소원의 종류를 글루코오스 또는 프룩토오스로 달리하여 제조된 미생물 유래 바이오 셀룰로오스를 근육세포 배양 스캐폴드로 사용하기에 적합한지 확인하기 위하여, 하이드로겔 형태의 바이오 셀룰로오스 스캐폴드에 근줄기세포를 씨딩 (seeding)하였다. 상기 근줄기세포는 비-인간 동물 유래 세포로서 닭, 돼지 또는 소 근조직으로부터 primary cell culture를 통해 직접 분리된 근줄기세포이다. 근줄기세포가 상기 스캐폴드에 잘 부착될 수 있도록 3시간 배양 후 추가적으로 배양 배지를 투입하였다. 24시간 추가 배양한 후 살아있는 세포는 녹색으로 염색되고 죽은 세포는 붉은색으로 염색되는 특성을 가진 LIVE & DEAD ASSAY (Thermofisher L3223) 시약을 사용하여 바이오 셀룰로오스 스캐폴드에 근줄기세포가 부착되어 살아있는지를 형광현미경으로 확인하였다 (도 3).

- [108] 그 결과, 글루코오스 또는 프룩토오스를 탄소원으로 사용하여 생산된 바이오 셀룰로오스와 미트 펩톤을 이용하여 생산된 바이오 셀룰로오스 스캐폴드 모두 근줄기세포가 부착되어 배양되고 있음을 녹색으로 염색된 세포로 확인할 수 있었으며, 90% 이상의 세포들이 생착되는 결과를 확인하였다. 또한, 위의 결과들을 통하여 미트 펩톤을 대두 펩톤으로 대신하더라도 생산되는 바이오 셀룰로오스의 세포 부착능은 변함이 없다는 것을 확인하였다.
- [109] **2-3. 탄소원의 혼합비율에 따른 바이오 셀룰로오스 스캐폴드의 단면 분석**
- [110] 글루코오스 또는 프룩토오스를 탄소원으로 이용하여 생산된 바이오 셀룰로오스 스캐폴드의 구조가 실제 고기와 차이가 있을 것으로 예상되어, 세밀한 구조를 갖는 바이오 셀룰로오스를 생산케 하는 글루코오스와 상대적으로 느슨한 구조를 갖는 바이오 셀룰로오스를 생산케 하는 프룩토오스의 혼합비율을 조절하여 실제 고기와 유사한 형태의 물리적 특성을 갖는 바이오 셀룰로오스 스캐폴드를 설계하였다.
- [111] 상기 아세트박터 액체 배지 100 중량부에 대하여 2 중량부의 탄소원을 포함하되, 상기 탄소원으로 글루코오스와 프룩토오스의 혼합비율 (글루코오스: 프룩토오스= 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5)을 조절하여 제조된 아세트박터 액체 배지에 본 발명의 아세트박터 속 균주를 접종하여 30 °C에서 72시간 이상 정치배양하여 하이드로겔 형태의 바이오 셀룰로오스 스캐폴드를 제조하여 각각의 스캐폴드 단면을 SEM을 통하여 관찰하였다 (도 4).
- [112] 그 결과, 탄소원으로 글루코오스와 프룩토오스의 혼합비율을 달리하여 생산된 바이오 셀룰로오스 스캐폴드의 단면 분석을 통해, 글루코오스의 포함량이 많아질수록 바이오 셀룰로오스의 층이 여러 겹으로 명확하게 형성됨을 확인하였으며, 글루코오스와 프룩토오스의 혼합비율 (글루코오스: 프룩토오스= 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5)을 조절하여 제조된 바이오 셀룰로오스 스캐폴드 모두 고기의 근육조직과 유사한 형태이지만 내부를 구성하는 구조의 세밀 정도는 모두 다르다는 것을 확인하였다.
- [113] **2-4. 탄소원의 혼합비율에 따른 바이오 셀룰로오스 스캐폴드의 세포 부착성 분석**
- [114] 상기 실시예 2-3에서 기재된 동일한 방법으로, 탄소원으로 글루코오스와 프룩토오스의 혼합비율 (글루코오스: 프룩토오스= 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5)을 조절하여 제조된 바이오 셀룰로오스 스캐폴드에 근줄기세포를 씨딩 (seeding)하여 상기 스캐폴드에 잘 부착될 수 있도록 3시간 배양 후 추가적으로 배양 배지를 투입하였다. 24시간 추가 배양한 후, LIVE & DEAD ASSAY (Thermofisher L3223) 시약을 사용하여 상기 바이오 셀룰로오스 스캐폴드에서의 근줄기세포 생착능을 형광현미경으로 분석하였다 (도 5).
- [115] 그 결과, 탄소원으로 글루코오스와 프룩토오스의 혼합비율 (글루코오스: 프룩토오스= 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5)을 조절하여 제조된 바이오 셀룰로오스 스캐폴드 모두 세포 부착능을 갖는 것을 확인하였다.

- [116] 실시예 3. 바이오 셀룰로오스의 생산 및 분쇄
- [117] 바이오 셀룰로오스의 생산을 위해 (사)한국미생물보존센터로부터 글루콘아세트박터 자일리누스 아종 자일리누스 (*Gluconacetobacter Xylinus* subsp. *Xylinus*) 균주 (기탁번호: KCCM41431)를 생균 형태로 분양받아 사용하였다.
- [118] -80 °C에서 보관중인 균주를 아세트박터 고체 배지 (0.5% 효모 추출물 (yeast extract), 0.5% 대두 펩톤, 2% 글루코오스, 0.27% 인산이나트륨 (disodium phosphate), 0.15% 구연산 (citric acid) 및 2% 한천 (agar) 포함)에 도말하여 48시간 동안 배양하였다.
- [119] 고체 배지에서 배양된 균주를 아세트박터 액체 배지 (0.5% 효모 추출물 (yeast extract), 0.5% 대두 펩톤, 2% 글루코오스, 0.27% 인산이나트륨 (disodium phosphate), 0.15% 구연산 (citric acid)) 접종하고 72시간 이상 정치 배양하여 바이오 셀룰로오스를 획득하였다. 획득한 바이오 셀룰로오스를 흐르는 증류수에 3회 세척하여 바이오 셀룰로오스에 포함되어 있는 배양액을 제거하였다. 0.1M NaOH 용액에서 바이오 셀룰로오스를 끓여주어 미생물을 제거하였으며, 0.1M NaOH 용액을 제거하기 위하여 증류수로 3회 세척하고 30% 에탄올에 냉장 보관하였다.
- [120] 보관된 바이오 셀룰로오스를 건조하기 위하여 증류수로 3회 세척하여 30% 에탄올을 제거하였으며, 50 °C 건조기 (Dryoven)에서 24시간 동안 건조하였다. 건조된 바이오 셀룰로오스는 수분이 제거되면서 매우 질기고 단단한 성질을 갖게되어 분쇄가 매우 어렵다.
- [121] 건조된 바이오 셀룰로오스의 특성을 극복하고 분쇄하기 위하여 액체 질소를 이용하여 단단하게 만들고, Rotor mill (Pulverisette 14)에서 14,000rpm으로 1.5mm 체반 (Sieve)에 걸러 1차 분쇄를 완료하였다. 1차 분쇄한 셀룰로오스의 입자 크기를 더 작게 만들기 위하여 2차 분쇄를 진행하였으며, 1차 분쇄에서 취득한 바이오 셀룰로오스를 다시 액체 질소를 통해 동결하고, Rotor mill의 분쇄 정도를 증가시키기 위하여 Impact bar ring으로 교체한 후 14,000rpm으로 분쇄하고 0.12mm의 체반에 걸러 2차 분쇄를 완료하였다. 추가 분쇄를 위하여 2차 분쇄가 완료된 바이오 셀룰로오스 분말을 다시 액체 질소를 통해 동결하고 Impact bar ring을 ACM ring으로 교체하고 14,000rpm에서 분쇄 후 0.12mm 체반에 걸러 최종 3차 분쇄하였다 (도 6).
- [122] 실시예 4. 바이오 셀룰로오스-하이드로겔 원료 복합 스캐폴드 제조
- [123] 상기 실시예 3의 방법으로 분말화한 바이오 셀룰로오스와 기존에 하이드로겔의 원료로 사용하는 알지네이트, 아가 또는 카라기난을 혼합하여 새로운 배양육용 스캐폴드를 제작하였다 (도 7).
- [124] 알지네이트-바이오 셀룰로오스 복합 스캐폴드를 제작하기 위하여 조성물 전체 100 중량부에 대해 2 중량부의 알지네이트를 상온에서 30분 동안 증류수에 용해시키고, 다양한 농도의 바이오 셀룰로오스 분말을 혼합하였다.

- [125] 알지네이트-바이오 셀룰로오스 혼합물을 균질기 (homogenizer)를 이용하여 13,500 rpm에서 3분 동안 추가 분쇄 및 혼합하였다. 알지네이트-바이오 셀룰로오스 혼합물을 틀에 담아 -80 °C에서 24시간 동안 동결 후 48시간 동안 동결건조하였다. 알지네이트의 가교를 위하여 1차 동결 건조 후 조성물 전체 100 중량부에 대해 1 중량부의 CaCl_2 를 처리하였으며, CaCl_2 를 제거하기 위해 증류수로 2시간 동안 세척 후 -80 °C에서 24시간 동안 동결 후 48시간 동안 동결건조 하여 스캐폴드를 제작하였다.
- [126] 아가-바이오 셀룰로오스와 카라기난-바이오 셀룰로오스 복합 스캐폴드를 제작하기 위하여 먼저, 조성물 전체 100 중량부에 대해 2 중량부의 아가와 카라기난 각각 80 °C에서 증류수에 용해하였다. 용해된 아가와 카라기난을 다양한 농도의 바이오 셀룰로오스 분말과 혼합한 후 균질기 (homogenizer)를 이용하여 13,500 rpm에서 3분 동안 2차 분쇄 및 혼합하였다. 아가-바이오 셀룰로오스, 카라기난-바이오 셀룰로오스 혼합액을 틀에 담아 -80 °C에서 24시간 동안 동결 후 48시간 동안 동결건조하여 스캐폴드를 제작하였다.
- [127] **실험예 1. 바이오 셀룰로오스 혼합 스캐폴드의 근줄기세포 배양**
- [128] 상기 실시예 4의 방법으로 제조된 바이오 셀룰로오스 분말 혼합 스캐폴드가 하이드로겔 원료인 알지네이트, 아가 또는 카라기난만으로 제작된 스캐폴드보다 근육세포 배양에 적합한지 확인하기 위하여, 바이오 셀룰로오스 분말 혼합 스캐폴드에 근줄기세포를 씨딩 (seeding)하였다. 상기 실험에 사용된 근줄기세포는 비-인간 유래 근줄기세포로 소, 닭 또는 돼지 등의 동물의 근 조직으로부터 1차 세포 배양 (primary cell culture)을 통해 직접 분리하여 사용하였다.
- [129] 근줄기세포를 각각의 스캐폴드에 씨딩하고, 잘 부착할 수 있도록 3시간 배양 후 배양 배지를 추가 투입하였다. 근줄기세포를 스캐폴드에서 최종 96시간 동안 배양하였으며, 근줄기세포가 스캐폴드에서 배양되고 있는지 확인하기 위하여 배양 후 24시간과 96시간의 근줄기세포의 생존을 LIVE&DEAD ASSAY (Thermofisher, L3223) 시약을 사용하여 확인하였다. LIVE&DEAD ASSAY 시약은 살아있는 세포는 초록색으로 죽은 세포는 붉은 색으로 염색하는 특성을 가지고 있어, 배양 후 24시간과 96시간의 형광 염색 사진을 통해 근줄기세포의 배양능을 확인하였다.
- [130] 그 결과, 알지네이트, 아가 또는 카라기난 각각의 원료로 제작된 스캐폴드는 세포 부착 및 세포 배양이 되지 않아 초록색으로 염색된 세포가 거의 관찰되지 않는 반면에 바이오 셀룰로오스 분말을 첨가한 스캐폴드에서는 모두 근줄기세포의 부착 및 배양을 확인하였다 (도 8a 내지 도 8c).
- [131] 또한, 전체 면적 대비 형광 염색 비율을 통해 세포 배양능을 추적한 결과 바이오 셀룰로오스 분말을 첨가하였을 경우 세포 배양능이 월등히 증가하는 것을 확인하였다 (도 9).
- [132] 이를 통해 세포 부착 및 배양이 되지 않는 알지네이트, 아가 또는 카라기난으로

제작된 스캐폴드의 단점을 바이오 셀룰로오스 분말을 첨가함으로써 세포 부착 및 배양이 가능하다는 것을 나타낸다.

- [133] 실험예 2. 바이오 셀룰로오스 혼합 스캐폴드의 단면 분석
- [134] LIVE&DEAD ASSAY를 통한 근줄기세포의 배양 결과가 실제 바이오 셀룰로오스 분말의 첨가 효과인지 다시 한번 확인하기 위하여, 바이오 셀룰로오스 혼합 스캐폴드의 단면을 분석하였다.
- [135] 상기 실시예 4의 방법으로 제조된 바이오 셀룰로오스 혼합 스캐폴드의 단면을 분석하기 위하여 20mA에서 60초 동안 각각의 스캐폴드를 백금 코팅하였으며, 코팅된 바이오 셀룰로오스 혼합 스캐폴드의 단면을 SEM (Scanning Electron Microscopy)을 통해 관찰하였다.
- [136] 조성물 전체 100 중량부에 대하여 2 중량부의 알지네이트, 아가 또는 카라기난을 포함한 스캐폴드의 단면은 규칙적이며, 일정 크기의 기공 (pore)을 형성하고 있는 것을 확인하였다.
- [137] 조성물 전체 100 중량부에 대하여 2 중량부의 알지네이트, 아가 또는 카라기난과 2 중량부의 바이오 셀룰로오스 분말이 혼합된 스캐폴드의 단면을 분석한 결과, 알지네이트, 아가 또는 카라기난으로 제작된 스캐폴드 사이에 바이오 셀룰로오스가 적절히 위치해 있는 것을 확인하였으며, 바이오 셀룰로오스 혼합 스캐폴드의 단면 분석을 통해 근줄기세포의 부착 및 배양이 가능한 것은 알지네이트, 아가 또는 카라기난 스캐폴드 사이에 위치한 바이오 셀룰로오스 분말의 효과임을 확인하였다 (도 10).
- [138] 실험예 3. 바이오 셀룰로오스 분말 첨가에 따른 바이오 셀룰로오스 혼합 스캐폴드의 조직감 비교
- [139] 바이오 셀룰로오스 분말의 첨가로 인해 근줄기세포의 부착 배양이 가능한 스캐폴드가 바이오 셀룰로오스 분말 첨가량에 따라 조직감을 조절할 수 있는지 확인하기 위하여, 조성물 전체 100 중량부에 대하여 0, 1, 5, 10 중량부의 바이오 셀룰로오스 분말을 2 중량부의 알지네이트, 아가 또는 카라기난과 혼합하여 혼합 스캐폴드를 제작한 후, 물리적 특성 변화를 관찰하였다 (도 11).
- [140] 그 결과, 바이오 셀룰로오스 분말 농도 의존적으로 경도 (Hardness), 검성 (Gumminess) 및 씹힘성 (Chewiness)이 증가하여 제작된 스캐폴드의 강도가 증가하는 것을 확인하였으며, 반대로 탄력성 (Springiness), 응집성 (Cohesiveness) 및 탄성 (Resilience)은 감소하는 것을 확인하였다 (도 12).
- [141] 또한, 닭, 소, 돼지고기의 경도 (Hardness), 검성 (Gumminess), 씹힘성 (Chewiness), 탄력성 (Springiness), 응집성 (Cohesiveness) 및 탄성 (Resilience)의 결과값이 바이오 셀룰로오스 분말 함량을 조절한 결과값 안에 모두 포함됨을 확인하였다 (도 12).
- [142] 이를 통해, 조성물 전체 100 중량부에 대하여, 1 내지 10 중량부의 바이오 셀룰로오스 분말을 2 중량부의 알지네이트, 아가 또는 카라기난과 혼합하여 제조된 스캐폴드는 닭, 소, 돼지 고기의 식감을 동일하게 재현할 수 있음을

나타낸다.

- [143] 조직감 특성 분석 결과를 바탕으로 바이오 셀룰로오스 분말의 첨가 농도에 의하여 바이오 셀룰로오스 복합 지지체 자체의 물리적 특성을 조절할 수 있으며, 실제 육류별 및 부위별 조직감을 바이오 셀룰로오스 분말 첨가로 인해 재현할 수 있음을 나타낸다.
- [144] 이상, 첨부된 도면을 참조로 하여 본 발명의 실시예를 설명하였지만, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 기술자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며, 제한적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

청구범위

- [청구항 1] 글루콘아세트박터 속 (*Gluconacetobacter* sp.) 유래 바이오 셀룰로오스 분말, 천연 고분자 겔화제 및 겔화 촉진제를 포함하는 배양육 스캐폴드 제조용 조성물로서, 상기 배양육 스캐폴드 제조용 조성물 100 중량부에 대하여, 상기 바이오 셀룰로오스 분말 1 내지 20 중량부, 상기 천연 고분자 겔화제 1 내지 5 중량부 및 상기 겔화 촉진제 1 내지 5 중량부를 포함하고, 상기 천연 고분자 겔화제는 알지네이트 (Alginate), 아가 (Agar) 및 카라기난 (carrageenan)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 배양육 스캐폴드 제조용 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 겔화 촉진제는 염화칼륨, 염화칼슘, 염화마그네슘 및 질산칼슘으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 금속염인 것을 특징으로 하는 배양육 스캐폴드 제조용 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 바이오 셀룰로오스 분말은 바이오 셀룰로오스를 동결시킨 후, 10,000 내지 15,000 rpm으로 분쇄된 것을 특징으로 하는 배양육 스캐폴드 제조용 조성물.
- [청구항 4] 제3항에 있어서,
상기 바이오 셀룰로오스는 식물성 펩톤을 포함하는 배지에서 생성되는 것을 특징으로 하는 배양육 스캐폴드 제조용 조성물.
- [청구항 5] 제4항에 있어서,
상기 식물성 펩톤은 대두 펩톤 (soy peptone), 밀 펩톤 (wheat peptone), 참두 펩톤 (broadbean peptone), 감자 펩톤 (potato peptone), 완두콩 펩톤 (pea peptone), 파파익 대두 펩톤 (papaic soy peptone) 및 루핀 펩톤 (lupin peptone)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 배양육 스캐폴드 제조용 조성물.
- [청구항 6] 제3항에 있어서,
상기 바이오 셀룰로오스는 글루코오스를 탄소원으로 포함하는 배지에서 생성되는 것을 특징으로 하는 배양육 스캐폴드 제조용 조성물.
- [청구항 7] 제1항 내지 제6항 중에서 선택된 어느 하나의 조성물로부터 제조된 배양육 스캐폴드.
- [청구항 8] 제7항에 있어서,
상기 조성물 내 바이오 셀룰로오스 분말의 농도가 증가함에 따라 상기 배양육 스캐폴드의 경도, 감성 및 씹힘성이 증가하는 것을 특징으로 하는 배양육 스캐폴드.
- [청구항 9] 제7항에 있어서,
상기 조성물 내 바이오 셀룰로오스 분말의 농도가 증가함에 따라 상기

배양육 스캐폴드의 탄력성, 응집성 및 탄성은 감소하는 것을 특징으로 하는 배양육 스캐폴드.

- [청구항 10] (a) 펩톤을 포함하는 배지에서 글루콘아세트박터 속 (*Gluconacetobacter* sp.)을 정치 배양하여 바이오 셀룰로오스를 수득하는 단계;
 (b) 상기 단계 (a)에서 수득한 바이오 셀룰로오스를 증류수로 세척하고 건조하는 단계;
 (c) 상기 건조된 바이오 셀룰로오스를 동결시킨 후, 10,000 내지 15,000 rpm으로 분쇄하여 바이오 셀룰로오스 분말을 수득하는 단계;
 (d) 상기 바이오 셀룰로오스 분말을 천연 고분자 겔화제와 혼합하는 단계; 및
 (e) 상기 (d)의 결과물을 동결건조한 후 겔화 촉진제를 첨가하는 단계를 포함하고, 상기 (e)의 겔화 촉진제를 첨가한 결과물 100 중량부에 대하여, 상기 바이오 셀룰로오스 분말 1 내지 20 중량부, 상기 천연 고분자 겔화제 1 내지 5 중량부 및 상기 겔화 촉진제 1 내지 5 중량부를 포함하고, 상기 천연 고분자 겔화제는 알지네이트 (Alginate), 아가 (Agar) 및 카라기난 (carrageenan)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 배양육 스캐폴드의 제조 방법.
- [청구항 11] 제10항에 있어서,
 상기 펩톤은 대두 펩톤 (soy peptone), 밀 펩톤 (wheat peptone), 참두 펩톤 (broadbean peptone), 감자 펩톤 (potato peptone), 완두콩 펩톤 (pea peptone), 파파익 대두 펩톤 (papaic soy peptone) 및 루핀 펩톤 (lupin peptone)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 배양육 스캐폴드의 제조 방법.
- [청구항 12] 제10항의 방법으로 제조된 배양육 스캐폴드에 비-인간 동물 유래 세포를 배양하여 제조되는 배양육.
- [청구항 13] 제12항에 있어서,
 상기 비-인간 동물 유래 세포는 근줄기세포, 근육 세포 및 이의 전구세포 (progenitor)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 배양육.
- [청구항 14] 제12항에 있어서,
 상기 비-인간 동물은 소, 양, 돼지, 가금류, 갑각류 및 어류로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 배양육.