

명세서

발명의 명칭: 배양육 스캐폴드, 이 의 제조방법 및 이를 포함하는 배양육

기술분야

- [1] 본 발명은 배양육 스캐폴드, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 배양육에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 배양육은 조직 공학 기술을 사용하여 세포 배양으로부터 생산되는 것으로서, 살아있는 동물을 사용한 전통적 식육 생산의 유망한 대체물이다. 동물을 사용한 육류는, 가축 성장, 특히 소를 사육하기 위해 물, 곡물, 토지 및 에너지를 포함하는 많은 소모성 자원이 이용되고 온실 가스 배출량이 크다는 문제가 있다. 이에 반해 배양육은 더 낮은 에너지 및 자원을 사용하며 온실 가스 배출량도 감소시킬 수 있다. 또한, 식육 생산을 위한 집약적 공장 농업 및 빈약한 동물 복지 조건은 식중독의 원인이 될 수 있으며, 많은 양의 사육 동물은 성장 호르몬과 항생제가 투입되고, 이는 결국 소비자로 전달된다. 반면, 무균 관리된 환경에서 육류를 생산하면 식품 안전성을 개선시키는 것을 도울 수 있다. 엄격한 규정과 통제된 조건에서 생산된 육류는 오염 물질이 전파될 가능성이 적고, 소비에 더 안전하다. 또한, 단백질 함량, 지방량 및 조성과 철, 아연 등을 포함하는 필수 미량 원소와 비타민을 제어하여 육류의 영양가를 향상시키고 더 건강하게 만들 수 있다. 그러나, 시각적, 영양적, 맛, 향 등 육류 제품의 특성을 향상시키면서 제품의 안전성을 증가시키는 것은 어려운 작업이다.
- [3] 일반적으로 세포의 성장은 세포 부착, 증식, 분화 및 조직화 등의 일련의 과정을 통해 이루어진다. 배양육이 제조되기 위해서는 세포가 조직화되는 것이 필수적이고, 이러한 조직화를 통해 질감 및 영양이 실제 고기와 유사하게 된다. 그러나, 일반적인 2차원 세포 배양 디쉬에서 배양하면 세포가 조직화되기 어려우며, 배양육 제조에 있어 세포가 부착하여 자랄 수 있는 스캐폴드는 세포의 성장에 일시적 혹은 영구적으로 영향을 끼치며 세포의 3차원 조직화를 가능하게 하는 필수적인 요소이다. 그럼에도, 기존 배양육 스캐폴드로 사용되는 물질은 스캐폴드 제조 시 세포 배양 환경에서 형태 유지를 하지 못할 정도로 기계적 물성이 낮은 한계점이 있다. 이를 해결하기 위하여 화학적 가교제를 첨가하여 스캐폴드의 물성을 증가시키는 방법이 있으나, 이는 세포 독성을 초래할 수 있다. 따라서 화학적 가교제 없이 실제 고기와 유사한 조직감을 구현할 수 있고, 세포 독성과 섭취에 대한 부담을 최소화하면서도 쉽고 빠르게 세포 배양을 할 수 있는 스캐폴드 개발이 필요한 실정이다.

- [4] 전술한 배경기술은 발명자가 본원의 개시 내용을 도출하는 과정에서 보유하거나 습득한 것으로서, 반드시 본 출원 전에 일반 공중에 공개된 공지기술이라고 할 수는 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 본 발명은 상술한 문제를 해결하기 위해, 우수한 물성을 가지고 세포 배양활성도가 우수한 배양육 스캐폴드, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 배양육을 제공하고자 한다.
- [6] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 해당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

- [7] 본 발명에 따른 배양육 스캐폴드는, 나노셀룰로오스; 및 고분자 하이드로겔;을 포함한다.
- [8] 일 실시예에 따르면, 상기 나노셀룰로오스는, 파우더, 현탁액 또는 하이드로겔 형태인 것일 수 있다.
- [9] 일 실시예에 따르면, 상기 나노셀룰로오스는, 직경이 1 nm 내지 10 μm 인 것일 수 있다.
- [10] 일 실시예에 따르면, 상기 나노셀룰로오스는, 점도가 12,000 cP 이상인 하이드로겔이고, 겔화 시간이 1 초 내지 30 초인 것일 수 있다.
- [11] 일 실시예에 따르면, 상기 나노셀룰로오스는, 엔도톡신이 5 EU/mL 이하인 것일 수 있다.
- [12] 일 실시예에 따르면, 상기 고분자 하이드로겔은, 콜라겐, 키토산, 피브린, 한천, 전분, 알지네이트, 히알루론산, 젤라틴, 텍스트란, 엘라스틴, 카라기난, 폴리에틸렌글리콜, 폴리아크릴산, 폴리비닐알코올, 폴리비닐피롤리돈, 폴리락트산 및 폴리글리콜산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나를 포함하는 것일 수 있다.
- [13] 일 실시예에 따르면, 상기 고분자 하이드로겔은, 비드 형태이거나 벌크 형태인 것일 수 있다.
- [14] 일 실시예에 따르면, 상기 나노셀룰로오스 및 상기 고분자 하이드로겔의 중량비는 1 : 4 내지 3 : 2인 것일 수 있다.
- [15] 일 실시예에 따르면, 상기 스캐폴드는, 공극 직경이 5 μm 내지 500 μm 이고, 공극률이 70 % 내지 95 %이고, 공극균일도가 10 % 내지 40%인 것일 수 있다.
- [16] 일 실시예에 따르면, 상기 스캐폴드는, 밀도가 1 g/cm³ 내지 10 g/cm³이고, 강도가 0.1 MPa 내지 20 MPa이고, 엔도톡신이 5 EU/mL 이하인 것일 수 있다.

- [17] 본 발명에 따른 배양육 스캐폴드의 제조방법은, 나노셀룰로오스를 준비하는 단계; 상기 나노셀룰로오스와 고분자 하이드로겔을 혼합하는 단계; 및 동결건조하는 단계;를 포함한다.
- [18] 일 실시예에 따르면, 상기 나노셀룰로오스를 준비하는 단계는, 셀룰로오스를 20 °C 내지 50 °C 온도에서 30 분 내지 3 시간 동안 처리하는 단계; 세척하는 단계; 및 나노화하는 단계;를 포함하는 것일 수 있다.
- [19] 일 실시예에 따르면, 상기 동결건조하는 단계는, -50 °C 내지 -80 °C 온도에서 48 시간 내지 72 시간 동안 동결건조하는 것일 수 있다.
- [20] 본 발명에 따른 배양육은, 본 발명에 따른 배양육 스캐폴드 또는 본 발명에 따른 배양육 스캐폴드의 제조방법에 의해 제조된 배양육 스캐폴드에 세포 또는 조직을 배양하여 제조된다.
- [21] 일 실시예에 따르면, 상기 스캐폴드는, 3차원적 구조를 유지하며 세포 또는 조직을 배양하는 것일 수 있다.
- [22] 일 실시예에 따르면, 상기 세포는, 근줄기세포, 골세포, 근육세포, 지방세포 및 줄기세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나를 포함하는 것일 수 있다.
- [23] 일 실시예에 따르면, 배양 후 세포 또는 조직 생존율이 80 % 이상인 것이고, 배양활성도가 20 % 이상인 것일 수 있다.

발명의 효과

- [24] 본 발명은 우수한 물성을 가지고 세포 배양활성도가 우수한 배양육 스캐폴드, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 배양육을 제공할 수 있다.
- [25] 구체적으로, 본 발명에 따른 배양육 스캐폴드는, 나노셀룰로오스 및 고분자 하이드로겔을 포함함으로써, 세포 독성이 없으며 공극 크기 및 밀도를 조절하여 스캐폴드의 물성을 향상시키고, 이에 따라 배양육 제조 시 세포 또는 조직의 우수한 배양활성도를 나타내어 쉽고 빠르게 고기와 유사한 조직감을 구현하는 배양육을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [26] 도 1a 및 도 1b는 본 발명의 실시예 및 비교예에 따른 배양육 이미지이다.
- [27] 도 2a 및 도 2b는 본 발명의 실시예 및 비교예에 따른 배양육 스캐폴드 이미지이다.
- [28] 도 3a 및 도 3b는 본 발명의 실시예 및 비교예에 따른 배양육 스캐폴드의 SEM 이미지이다.
- [29] 도 4a 및 도 4b는 본 발명의 실시예 및 비교예에 따른 배양육 스캐폴드에서 세포 배양을 확인한 이미지이다.
- [30] 도 5는 본 발명의 실시예에 따른 세포생존율을 나타낸 그래프이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [31] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 그러나, 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있어서 특허출원의 권리 범위가 이러한 실시예들에 의해 제한되거나 한정되는 것은 아니다. 실시예들에 대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물이 권리 범위에 포함되는 것으로 이해되어야 한다.
- [32] 실시예에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안 된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [33] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.
- [34] 또한, 첨부 도면을 참조하여 설명함에 있어, 도면 부호에 관계없이 동일한 구성 요소는 동일한 참조부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다. 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다. 또한, 실시예의 구성 요소를 설명하는 데 있어서, 제 1, 제 2, A, B, (a), (b) 등의 용어를 사용할 수 있다. 이러한 용어는 그 구성 요소를 다른 구성 요소와 구별하기 위한 것일 뿐, 그 용어에 의해 해당 구성 요소의 본질이나 차례 또는 순서 등이 한정되지 않는다. 어떤 구성 요소가 다른 구성 요소에 "연결", "결합" 또는 "접속"된다고 기재된 경우, 그 구성 요소는 그 다른 구성 요소에 직접적으로 연결되거나 접속될 수 있지만, 각 구성 요소 사이에 또 다른 구성 요소가 "연결", "결합" 또는 "접속"될 수도 있다고 이해되어야 할 것이다.
- [35] 어느 하나의 실시예에 포함된 구성요소와, 공통적인 기능을 포함하는 구성요소는, 다른 실시예에서 동일한 명칭을 사용하여 설명하기로 한다. 반대되는 기재가 없는 이상, 어느 하나의 실시예에 기재한 설명은 다른 실시예에도 적용될 수 있으며, 중복되는 범위에서 구체적인 설명은 생략하기로 한다.
- [36]
- [37] 본 발명에 따른 배양육 스캐폴드는, 나노셀룰로오스; 및 고분자 하이드로겔;을 포함한다.
- [38] 본 발명에 따른 배양육 스캐폴드는, 배양육을 제조하기 위해 세포의 부착, 성숙, 분화 및 증식을 위한 표면 및 지지체를 제공하는 것으로서, 종래에 배양육 스캐폴드로 사용되는 물질이 세포 배양 환경에서 형태 유지를 하지 못할 정도로 기계

적 물성이 낮거나, 단일 재료만을 이용해 제작하는 경우 세포부착력이 낮아 세포 성장이 어렵다는 한계점을 보완할 수 있다. 즉, 나노셀룰로오스 및 고분자 하이드로겔을 포함함으로써, 공극 크기 및 밀도를 조절할 수 있으며 이에 따라 스캐폴드의 물성 및 영양분 공급, 노폐물 배출 증가의 물질대사를 향상시켜 배양활성도가 높아 조직감이 우수한 배양육을 제공할 수 있다.

[39] 상기 나노셀룰로오스는 높은 혼화성으로 상기 고분자 하이드로겔과 쉽게 혼합되어 하이드로겔의 낮은 기계적 물성을 보완할 수 있다.

[40] 상기 배양육 스캐폴드는, 나노키틴 또는 레반-카테콜 접합체를 더 포함하는 것일 수 있다.

[41]

[42] 일 실시예에 따르면, 상기 나노셀룰로오스는, 파우더, 현탁액 또는 하이드로겔 형태인 것일 수 있다.

[43] 본 발명에 따른 나노셀룰로오스는, 파우더, 현탁액 또는 하이드로겔 형태인 것으로 필요에 따라 적합한 형태의 나노셀룰로오스를 선택할 수 있다.

[44] 나노셀룰로오스는 셀룰로오스를 10억분의 1로 쪼개 나노화한 고분자 물질로서, 철보다 5배 강하고, 5배 가벼우며, 플렉시블하고, 친환경적이며 항박테리아성의 안전한 특징이 있다.

[45]

[46] 일 실시예에 따르면, 상기 나노셀룰로오스는, 직경이 1 nm 내지 10 μm 인 것일 수 있다.

[47] 상기 나노셀룰로오스 직경은, 바람직하게는, 1 nm 내지 1 μm ; 1 nm 내지 500 nm; 1 nm 내지 100 nm; 1 nm 내지 50 nm; 50 nm 내지 10 μm ; 50 nm 내지 1 μm ; 50 nm 내지 500 nm; 50 nm 내지 100 nm; 100 nm 내지 10 μm ; 100 nm 내지 1 μm ; 100 nm 내지 500 nm; 500 nm 내지 10 μm ; 500 nm 내지 1 μm ; 또는 1 μm 내지 10 μm ; 인 것일 수 있다.

[48]

[49] 직경이 상기 범위 미만일 경우 기계적 강도가 저하되어 구조체를 유지하기 어려운 문제가 있을 수 있고, 상기 범위 초과일 경우 공극의 증가, 비표면적의 감소 등으로 스캐폴드의 효과가 저하되는 문제가 있을 수 있다.

[50]

[51] 일 실시예에 따르면, 상기 나노셀룰로오스는, 점도가 12,000 cP 이상인 하이드로겔이고, 겔화 시간이 1 초 내지 30 초인 것일 수 있다.

[52] 상기 나노셀룰로오스가 하이드로겔 형태인 경우, 점도가 12,000 cP 이상인 것일 수 있다. 점도가 상기 범위 미만일 경우 스캐폴드가 정상적으로 만들어지지 않는 문제가 있을 수 있다. 상기 점도 이상일 경우 다양한 환경조건에서도 안정적으로 구조를 유지할 수 있는 장점이 있다.

[53] 상기 나노셀룰로오스는, 겔화 시간이, 바람직하게는 1 초 내지 20 초인 것일 수 있고, 더 바람직하게는 1 초 내지 10 초인 것일 수 있다. 종래 나노셀룰로오스는 겔화 되지 않거나, 겔화를 위해 특정 물질을 첨가해야 하는 등의 문제가 있었으

나, 본 발명에 따른 나노셀룰로오스는 짧은 겔화 시간으로 인해 별도의 첨가제가 필요하지 않으며, 스캐폴드 제조 시간을 단축시킬 수 있으며, 특히 장기 노출에 따른 오염을 방지할 수 있다.

[54]

[55] 일 실시예에 따르면, 상기 나노셀룰로오스는, 엔도톡신이 5 EU/mL 이하인 것일 수 있다.

[56] 엔도톡신은 강력한 발열물질 중 하나인 독성물질로서, 생물학적 안전성을 나타내는 지표일 수 있다. 본 발명에 따른 배양육 스캐폴드는, 스캐폴드에 세포를 배양하여 배양육을 제조하고 이를 섭취하는 것으로서, 생물학적 안전성을 확보하는 것이 필수적이다. 엔도톡신이 상기 범위 이하일 경우 세포 독성이 없어 배양육 제조 시 세포생존력이 높고, 인체에 무해하여 식용 배양육 스캐폴드로 적합할 수 있다.

[57]

[58] 일 실시예에 따르면, 상기 나노셀룰로오스는, 농도가 0.1 mg/mL 내지 10 mg/mL 인 것일 수 있다.

[59] 나노셀룰로오스 농도는 적절히 선택하여 사용할 수 있으나, 바람직하게는, 스캐폴드 내 나노셀룰로오스 농도가 상기 범위일 때 물성이 우수한 스캐폴드를 제조할 수 있다.

[60]

[61] 일 실시예에 따르면, 상기 고분자 하이드로겔은, 콜라겐, 키토산, 피브린, 한천, 전분, 알지네이트, 히알루론산, 젤라틴, 텍스트란, 엘라스틴, 카라기난, 폴리에틸렌글리콜, 폴리아크릴산, 폴리비닐알코올, 폴리비닐피롤리돈, 폴리락트산 및 폴리글리콜산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나를 포함하는 것일 수 있다.

[62] 하이드로겔은, 다량의 수분을 함유하여 액체와 고체의 중간 성질을 갖는 것으로, 고분자 사슬이 3차원 구조를 이루고 많은 양의 물을 흡수하여 팽윤하지만 가교(Crosslink) 구조에 따라 물에는 용해되지 않는 성질을 가지고 있으며, 실제 생물체의 조직을 모사할 수 있다. 상기 고분자 하이드로겔은, 배양육 제조에 이용될 수 있는 고분자라면 제한되지 않고 사용할 수 있다. 상기 고분자 하이드로겔은 물질을 용해하고 조형하는 과정이 간단해 구조체를 만들기 용이한 장점이 있으며, 이에 따라, 배양육을 제조하는 과정에서 2차원 세포 배양이 실제 조직과는 다른 환경이 조성되는 문제점을 개선하여, 3차원 세포 배양 스캐폴드로서 사용될 수 있다.

[63]

[64] 일 실시예에 따르면, 상기 고분자 하이드로겔은, 비드 형태이거나 벌크 형태인 것일 수 있다.

[65] 본 발명에 따른 고분자 하이드로겔은, 비드 또는 벌크 형태인 것으로 필요에 따라 적합한 형태의 고분자 하이드로겔을 선택할 수 있다.

- [66]
- [67] 일 실시예에 따르면, 상기 나노셀룰로오스 및 상기 고분자 하이드로겔의 중량비는 1:4 내지 3:2인 것일 수 있다.
- [68] 상기 나노셀룰로오스 및 상기 고분자 하이드로겔의 중량비는, 바람직하게는, 1:4 내지 5:4; 1:4 내지 1:1; 1:4 내지 3:4; 1:4 내지 1:2; 1:2 내지 3:2; 1:2 내지 5:4; 1:2 내지 1:1; 1:2 내지 3:4; 3:4 내지 3:2; 3:4 내지 5:4; 3:4 내지 1:1; 1:1 내지 3:2; 1:1 내지 5:4; 또는 5:4 내지 3:2;인 것일 수 있다.
- [69] 상기 나노셀룰로오스 및 상기 고분자 하이드로겔의 배합비에 따라 스캐폴드의 공극 및 밀도를 조절할 수 있으며, 상기 언급된 범위의 중량비로 혼합될 때 최적의 공극 크기, 밀도 및 공극균일도를 나타내어 우수한 물성을 갖는 스캐폴드를 제조할 수 있다.
- [70]
- [71] 일 실시예에 따르면, 상기 스캐폴드는, 공극 직경이 5 μm 내지 500 μm 이고, 공극률이 70 % 내지 95 %이고, 공극균일도가 10 % 내지 40%인 것일 수 있다.
- [72] 상기 스캐폴드는, 나노셀룰로오스 및 고분자 하이드로겔을 혼합하면서, 공극을 형성할 수 있다. 상기 공극은 배양육 세포의 증식, 분화 및 부착에 관여하여 스캐폴드의 물성을 조절할 수 있다. 본 발명에 따른 배양육 스캐폴드는, 나노셀룰로오스 첨가로 인해 공극의 균일도가 증가하고 공극 형태를 잘 유지할 수 있으며, 이로 인해 물질대사, 즉, 영양분 공급 및 노폐물 배출이 증가할 수 있다.
- [73] 상기 공극 직경은 공극 중심을 지나는 가장 긴 길이를 의미하는 것일 수 있다. 바람직하게는, 5 μm 내지 400 μm ; 5 μm 내지 300 μm ; 5 μm 내지 200 μm ; 5 μm 내지 100 μm ; 50 μm 내지 500 μm ; 50 μm 내지 400 μm ; 50 μm 내지 300 μm ; 50 μm 내지 200 μm ; 50 μm 내지 100 μm ; 100 μm 내지 500 μm ; 100 μm 내지 400 μm ; 100 μm 내지 300 μm ; 100 μm 내지 200 μm ; 200 μm 내지 500 μm ; 200 μm 내지 400 μm ; 200 μm 내지 300 μm ; 300 μm 내지 500 μm ; 300 μm 내지 400 μm ; 또는 400 μm 내지 500 μm ;인 것일 수 있다.
- [74] 상기 공극률은, 바람직하게는, 70 % 내지 90 %; 70 % 내지 85 %; 70 % 내지 80 %; 70 % 내지 75 %; 75 % 내지 95 %; 75 % 내지 90 %; 75 % 내지 85 %; 75 % 내지 80 %; 80 % 내지 95 %; 80 % 내지 90 %; 80 % 내지 85 %; 85 % 내지 95 %; 85 % 내지 90 %; 또는 90 % 내지 95 %;인 것일 수 있다.
- [75] 상기 공극균일도는, 평균 공극 크기와 각각의 공극 크기의 차이를 의미하는 것일 수 있으며, 상기 공극 크기는 상기 평균 공극 크기 대비 10 % 내지 40 % 크거나 작을 수 있다. 바람직하게는, 10 % 내지 30 %; 10 % 내지 20 %; 20 % 내지 40 %; 20 % 내지 30 %; 또는 30 % 내지 40 %;인 것일 수 있다.
- [76] 공극 직경이 상기 범위 미만일 경우 세포부착률이 감소하는 문제가 있을 수 있고, 상기 범위 초과일 경우 세포 배양 시 지지체로서 역할을 하지 못하는 문제가 있을 수 있다.

- [77] 공극률이 상기 범위 미만일 경우 세포 성장이 저해되는 문제가 있을 수 있고, 상기 범위 초과일 경우 세포 배양 시 지지체로서 역할을 하지 못하는 문제가 있을 수 있다.
- [78] 공극균일도가 상기 범위 초과일 경우 세포 배양 시 재현성이 떨어지는 문제가 있을 수 있다.
- [79] 스캐폴드가 적절한 공극 크기, 공극률, 공극균일성을 가질 때 세포 배양 시 스캐폴드 형태가 안정하게 유지되면서 세포가 보다 쉽게 스캐폴드 내부로 침투 가능하며, 영양분 순환이나 산소의 공급을 높일 수 있어 세포가 성장할 수 있는 최적의 환경을 제공할 수 있다.
- [80]
- [81] 일 실시예에 따르면, 상기 스캐폴드는, 밀도가 1 g/cm^3 내지 10 g/cm^3 이고, 강도가 0.1 MPa 내지 20 MPa 이고, 엔도톡신이 5 EU/mL 이하인 것일 수 있다.
- [82] 상기 스캐폴드는, 나노셀룰로오스 및 고분자 하이드로겔의 혼합으로 인해, 우수한 물성의 스캐폴드를 제공할 수 있다. 스캐폴드의 물성은 밀도, 강도, 인성, 강성, 세포생존율 등으로 나타낼 수 있으며, 상기 밀도는, 바람직하게는, 1 g/cm^3 내지 8 g/cm^3 ; 1 g/cm^3 내지 5 g/cm^3 ; 1 g/cm^3 내지 3 g/cm^3 ; 3 g/cm^3 내지 10 g/cm^3 ; 3 g/cm^3 내지 8 g/cm^3 ; 3 g/cm^3 내지 5 g/cm^3 ; 5 g/cm^3 내지 10 g/cm^3 ; 또는 5 g/cm^3 내지 8 g/cm^3 ;인 것일 수 있고, 상기 강도는, 바람직하게는, 0.1 MPa 내지 10 MPa ; 0.1 MPa 내지 5 MPa ; 0.1 MPa 내지 1 MPa ; 0.1 MPa 내지 0.5 MPa ; 0.5 MPa 내지 20 MPa ; 0.5 MPa 내지 10 MPa ; 0.5 MPa 내지 5 MPa ; 0.5 MPa 내지 1 MPa ; 1 MPa 내지 20 MPa ; 1 MPa 내지 10 MPa ; 1 MPa 내지 5 MPa ; 5 MPa 내지 20 MPa ; 5 MPa 내지 10 MPa ; 또는 10 MPa 내지 20 MPa ;인 것일 수 있다.
- [83] 밀도가 상기 범위 미만일 경우 배양 시 세포 간의 결합이 형성되지 않아 식감이 떨어지는 문제가 있을 수 있고, 상기 범위 초과일 경우 배양 시 세포가 분화할 공간이 줄어들어 충분히 성숙하지 못하는 문제가 있을 수 있다. 상기 강도는 압축 강도인 것일 수 있으며, 강도가 상기 범위 미만일 경우 지지체로서 역할을 하지 못해 스캐폴드가 무너지는 문제가 있을 수 있고, 상기 범위 초과일 경우 세포가 안정적으로 성장하지 못하는 문제가 있을 수 있다. 상기 범위의 물성을 가질 때 세포가 안정적으로 쉽고 빠르게 배양될 수 있으며, 세포 배양 시 세포생존율이 80 % 이상일 수 있다.
- [84] 본 발명에 따른 배양육 스캐폴드는, 나노셀룰로오스를 첨가함으로써 최적의 밀도와 강도를 나타내며 이에 따라 물리적 인장력을 인가하더라도 쉽게 무너지지 않는 특성이 있다. 이는 배양육 제조 시 인장력을 가해 세포 정렬이 가능하고 분화에 도움을 줘 배양육의 식감을 높이는데 도움을 줄 수 있다.
- [85] 배양육 스캐폴드는, 배양육을 제조하고 이를 섭취해야 하므로, 생물학적 안전성이 필수적으로 요구된다. 독성물질인 엔도톡신을 통해 안전성을 나타낼 수 있

으며, 엔도톡신이 상기 범위 이하일 경우 세포 독성이 없어 세포생존력이 높고, 인체에 무해하여 식용 배양육 스캐폴드로 적합할 수 있다.

- [86]
- [87] 본 발명에 따른 배양육 스캐폴드의 제조방법은, 나노셀룰로오스를 준비하는 단계; 상기 나노셀룰로오스와 고분자 하이드로겔을 혼합하는 단계; 및 동결건조하는 단계;를 포함한다.
- [88] 본 발명에 따른 배양육 스캐폴드는, 나노셀룰로오스 및 고분자 하이드로겔을 혼합하여 제조함으로써 우수한 물성을 가지는 안전한 스캐폴드를 제공할 수 있으며, 이를 통해 우수한 조직감을 가지는 배양육을 제조할 수 있다.
- [89]
- [90] 일 실시예에 따르면, 상기 나노셀룰로오스를 준비하는 단계는, 셀룰로오스를 20 °C 내지 50 °C 온도에서 30 분 내지 3 시간 동안 처리하는 단계; 세척하는 단계; 및 나노화하는 단계;를 포함하는 것일 수 있다.
- [91] 상기 셀룰로오스는, 셀룰로오스 함량이 70 % 이상인 목질계 또는 비목질계 원료를 펄프 및 리파이너리를 이용하여 해섬 등의 전처리를 실시한 것일 수 있다.
- [92] 상기 처리하는 단계는, 전처리 된 셀룰로오스를 템포(TEMPO) 또는 엔자임(Enzyme)을 처리하거나 아무것도 처리하지 않은 셀룰로오스를 상기 조건에서 반응시키는 것일 수 있다. 처리하는 단계는, 바람직하게는, 30 분 내지 2 시간인 것일 수 있고, 더 바람직하게는, 1 시간 내지 2 시간인 것일 수 있다.
- [93] 상기 처리하는 단계의 온도 및 시간이 상기 범위를 벗어나는 경우 스캐폴드에 적합한 기계적 강도와 점도를 가지는 나노셀룰로오스 제조에 문제가 있을 수 있다.
- [94] 상기 세척하는 단계는, 바람직하게는, 2회 이상 수행되는 것일 수 있다.
- [95] 상기 나노화하는 단계는, 고압균질기 또는 초음파유화기 등의 나노화 장비로 1회 이상 처리하여 나노화하는 것일 수 있다.
- [96] 셀룰로오스는 직경이 크고 표면적이 낮으며, 섬유 간 균일성이 떨어져 균일한 공극크기와 공극률을 가지는 스캐폴드를 제조하는데 어려우나, 본 발명에 따른 제조방법으로 획득한 나노셀룰로오스는 직경이 매우 작고 표면적이 크며, 섬유 간 균일성이 매우 높을 뿐 아니라 공극률이 높아 세포에 산소 및 영양분을 원활하게 공급함으로써, 세포 부착 및 성장을 위한 균일하고 안정적인 지지체를 제조할 수 있다.
- [97]
- [98] 일 실시예에 따르면, 상기 동결건조하는 단계는, -50 °C 내지 -80 °C 온도에서 48 시간 내지 72 시간 동안 동결건조하는 것일 수 있다.
- [99] 상기 온도 및 시간 범위 미만으로 동결건조할 경우 완전히 건조되지 않아 형태가 불안정하거나 균일하지 않는 문제가 있을 수 있고, 상기 범위 초과로 동결건조할 경우 표면의 과다 건조로 인해 내부와 물성이 달라질 수 있는 문제가 있을

수 있다. 상기 범위 내에서 동결건조할 경우 수분이 완전히 제거될 뿐 아니라 표면과 내부의 물성과 구조가 동일할 수 있다.

[100]

[101] 본 발명에 따른 배양육은, 본 발명에 따른 배양육 스캐폴드 또는 본 발명에 따른 배양육 스캐폴드의 제조방법에 의해 제조된 배양육 스캐폴드에 세포 또는 조직을 배양하여 제조된다.

[102] 종래에 배양육은 조직감 및 제품의 안전성을 획득하기 어려운 문제가 있다. 본 발명에 따른 배양육은, 나노셀룰로오스 및 고분자 하이드로겔을 포함하는 배양육 스캐폴드에 세포 또는 조직을 배양하는 것으로서, 세포 또는 조직의 배양활성도가 높아 쉽고 빠르게 배양할 수 있으며 배양 과정 중 영양분 공급 및 노폐물 배출이 우수하여 향상된 식감 및 질감을 가지는 조직감이 우수하고 안전한 배양육을 얻을 수 있다.

[103] 상기 배양은 세포 또는 조직을 접종하거나 프린팅하는 것일 수 있다.

[104]

[105] 일 실시예에 따르면, 상기 스캐폴드는, 3차원적 구조를 유지하며 세포 또는 조직을 배양하는 것일 수 있다.

[106] 종래에 세포 배양은 페트리 디쉬(petri dish)를 이용한 2차원 세포 배양 방법을 이용하여 수행해왔다. 하지만, 2차원 세포 배양의 방법으로 세포를 배양할 경우 세포의 형태를 변화시키거나, 세포 분열은 진행되지만 유전자 발현이 달라질 수 있는 등 실제 조직과는 다른 환경이 조성되는 문제가 있다. 따라서, 3차원 세포 배양법으로 실제 조직과 유사하게 세포를 배양하기 위한 방법들이 연구되고 있으며, 이에 따라, 세포 외 기질의 특성과 유사한 구조를 갖는 세포 부착 스캐폴드가 중요하다. 단일 재료만을 이용해 제작한 스캐폴드는 세포 배양용 스캐폴드로 사용하기에 세포 부착력이 매우 낮아 효과적인 세포 성장이 어렵다. 본 발명에 따른 배양육은 나노셀룰로오스 및 고분자 하이드로겔을 포함하는 배양육 스캐폴드를 이용하여 나노셀룰로오스 표면의 수산화기 간의 수소결합을 유도하여 그물망 구조를 형성함으로써 3차원적 구조를 유지하며 배양할 수 있으며, 이에 따라 효과적인 세포 성장으로 인해 세포 또는 조직 생존율 및 배양활성도가 높아 우수한 배양육을 제조할 수 있다.

[107]

[108] 일 실시예에 따르면, 상기 세포는, 근줄기세포, 골세포, 근육세포, 지방세포 및 줄기세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나를 포함하는 것일 수 있다.

[109] 상기 세포는, 비-인간 동물 유래 세포인 것일 수 있으며, 배양육 제조에 이용될 수 있는 세포라면 제한되지 않으나, 바람직하게는, 근줄기세포인 것일 수 있다.

[110]

[111] 일 실시예에 따르면, 배양 후 세포 또는 조직 생존율이 80 % 이상인 것이고, 배양활성도가 20 % 이상인 것일 수 있다.

- [112] 본 발명에 따른 배양육은 나노셀룰로오스 및 고분자 하이드로겔을 포함하는 스캐폴드를 사용하여 세포 또는 조직을 배양하는 것으로서, 배양 시 세포 또는 조직 생존율 및 배양활성도가 우수하여 쉽고 빠르게 우수한 조직감의 배양육을 형성할 수 있다.
- [113] 상기 생존율은, 배양 전 세포 생존 수 대비 배양 후 세포 생존 수의 비율인 것일 수 있다.
- [114] 종래에는 스캐폴드의 물성이 낮아 형태를 유지하지 못하거나 세포 부착력이 떨어짐에 따라 물질대사가 원활히 이루어지지 못해 생존율이 낮았으나, 본 발명의 배양육은 세포 독성이 낮으면서 스캐폴드의 세포부착력이 뛰어나므로, 상기 범위 이상의 높은 생존율 및 배양활성도를 나타내면서 우수한 물성의 배양육을 제공할 수 있다.
- [115]
- [116] 본 발명에 따른 배양육 스캐폴드는, 나노셀룰로오스 및 고분자 하이드로겔을 포함하는 것으로서, 본 발명에 따른 나노셀룰로오스 및 고분자 하이드로겔의 비율에 따라 최적의 공극 크기와 밀도를 가지는 우수한 물성의 스캐폴드를 제조할 수 있으며, 이에 따라 배양육 제조 시 세포 또는 조직 배양활성도 및 생존율이 우수하여 쉽고 빠르게 우수한 조직감 및 세포 독성이 없는 안전한 배양육을 제조할 수 있다.
- [117]
- [118] 이하, 실시예 및 비교예에 의하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다.
- [119] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [120]
- [121] 도 1a 및 도 1b는 본 발명의 실시예 및 비교예에 따른 배양육 이미지이다. 도 1a를 참조하면, 본 발명에 따른 스캐폴드 배양육으로서 밀도가 높고 조직이 치밀한 것을 확인할 수 있으며, 도 1b의 비교예의 경우 형태가 불안정하고 조직이 매우 느슨한 것을 확인할 수 있다.
- [122] 도 2a 및 도 2b는 본 발명의 실시예 및 비교예에 따른 배양육 스캐폴드 이미지이다. 도 2a 및 도 2b를 참조하면, 도 2a 실시예 및 도 2b 비교예를 비교할 때 실시예의 경우 밀도가 더 높고 균일한 공극을 갖는 것을 확인할 수 있다.
- [123] 도 3a 및 도 3b는 본 발명의 실시예 및 비교예에 따른 배양육 스캐폴드의 SEM 이미지이다. 도 3a는 나노셀룰로오스 함량이 0인 스캐폴드, 도 3b는 나노셀룰로오스 및 고분자 하이드로겔의 중량비가 2.5 : 7.5인 스캐폴드이다. 도 3a 및 도 3b를 참조하면, 나노셀룰로오스 첨가에 따라 공극 사이즈가 작아지는 것을 확인할 수 있으며, 공극이 균일한 것을 알 수 있다.
- [124] 도 4a 및 도 4b는 본 발명의 실시예 및 비교예에 따른 배양육 스캐폴드에서 세포 배양을 확인한 이미지이다. 도 4a는 비교예, 도 4b는 실시예의 결과이다. 이를 통

해 개발한 배양육 스캐폴드의 경우 동일한 배양기간 동안 세포 성장속도가 높고, 스캐폴드 전반에 고르게 세포가 성장하는 것을 확인할 수 있다.

[125] 도 5는 본 발명의 실시예에 따른 세포생존율을 나타낸 그래프이다. 세포 생존 능력을 알아보기 위해 WST-1 분석법을 이용해 세포 생존능(cell viability)을 측정하였으며, 본 발명에 따라 제조된 스캐폴드로 제조된 배양육의 세포 생존율이 우수한 것을 확인할 수 있으며, 농도가 증가할 수록 세포생존률 또한 함께 증가하는 것을 알 수 있다.

[126]

[127] 이상과 같이 실시예들이 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기를 기초로 다양한 기술적 수정 및 변형을 적용할 수 있다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 시스템, 구조, 장치, 회로 등의 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

[128] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

청구범위

- [청구항 1] 나노셀룰로오스; 및
고분자 하이드로겔;을 포함하는,
배양육 스캐폴드.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 나노셀룰로오스는, 파우더, 현탁액 또는 하이드로겔 형태인 것인,
배양육 스캐폴드.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 나노셀룰로오스는, 직경이 1 nm 내지 10 μm 인 것인,
배양육 스캐폴드.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 나노셀룰로오스는, 점도가 12,000 cP 이상인 하이드로겔이고,
겔화 시간이 1 초 내지 30 초인 것인,
배양육 스캐폴드.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 나노셀룰로오스는, 엔도톡신이 5 EU/mL 이하인 것인,
배양육 스캐폴드.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 고분자 하이드로겔은, 콜라겐, 키토산, 피브린, 한천, 전분, 알지네이트, 히알루론산, 젤라틴, 텍스트란, 엘라스틴, 카라기난, 폴리에틸렌글리콜, 폴리아크릴산, 폴리비닐알코올, 폴리비닐피롤리돈, 폴리락트산 및 폴리글리콜산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나를 포함하는 것인,
배양육 스캐폴드.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 고분자 하이드로겔은, 비드 형태이거나 벌크 형태인 것인,
배양육 스캐폴드.
- [청구항 8] 제1항에 있어서,
상기 나노셀룰로오스 및 상기 고분자 하이드로겔의 중량비는 1 : 4 내지 3 : 2인 것인,
배양육 스캐폴드.
- [청구항 9] 제1항에 있어서,
상기 스캐폴드는, 공극 직경이 50 μm 내지 500 μm 이고,
공극률이 70 % 내지 95 %이고,
공극균일도가 10 % 내지 40 %인 것인,
배양육 스캐폴드.
- [청구항 10] 제1항에 있어서,

- 상기 스캐폴드는, 밀도가 1 g/cm^3 내지 10 g/cm^3 이고,
 강도가 0.1 MPa 내지 20 MPa 이고,
 엔도톡신이 5 EU/mL 이하인 것인,
 배양육 스캐폴드.
- [청구항 11] 나노셀룰로오스를 준비하는 단계;
 상기 나노셀룰로오스와 고분자 하이드로 겔을 혼합하는 단계; 및
 동결건조하는 단계;를 포함하는,
 배양육 스캐폴드의 제조방법.
- [청구항 12] 제11항에 있어서,
 상기 나노셀룰로오스를 준비하는 단계는,
 셀룰로오스를 20°C 내지 50°C 온도에서 30 분 내지 3 시간 동안 처리하는
 단계;
 세척하는 단계; 및
 나노화하는 단계;를 포함하는 것인,
 배양육 스캐폴드의 제조방법.
- [청구항 13] 제11항에 있어서,
 상기 동결건조하는 단계는, -50°C 내지 -80°C 온도에서 48 시간 내지 72
 시간 동안 동결건조하는 것인,
 배양육 스캐폴드의 제조방법.
- [청구항 14] 제1항의 배양육 스캐폴드 또는 제11항의 배양육 스캐폴드의 제조방법에
 의해 제조된 배양육 스캐폴드에 세포 또는 조직을 배양하여 제조되는,
 배양육.
- [청구항 15] 제14항에 있어서,
 상기 스캐폴드는, 3차원적 구조를 유지하며 세포 또는 조직을 배양하는
 것인,
 배양육.
- [청구항 16] 제14항에 있어서,
 상기 세포는, 근줄기세포, 골세포, 근육세포, 지방세포 및 줄기세포로 이
 루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나를 포함하는 것인,
 배양육.
- [청구항 17] 제14항에 있어서,
 배양 후 세포 또는 조직 생존율이 80 % 이상인 것이고,
 배양활성도가 20 % 이상인 것인,
 배양육.