



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0012204
(43) 공개일자 2022년02월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/077 (2010.01) A23L 13/00 (2016.01)
C12M 1/12 (2006.01) C12M 1/42 (2017.01)
C12M 3/00 (2006.01) C12N 13/00 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0658 (2013.01)
A23L 13/00 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2021-0096378
(22) 출원일자 2021년07월22일
심사청구일자 2021년07월22일
(30) 우선권주장
1020200090734 2020년07월22일 대한민국(KR)

(71) 출원인
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
홍진기
서울특별시 서대문구 연세로 50 연세대학교
박소현
서울특별시 서대문구 연세로 50 연세대학교
(74) 대리인
특허법인 플러스

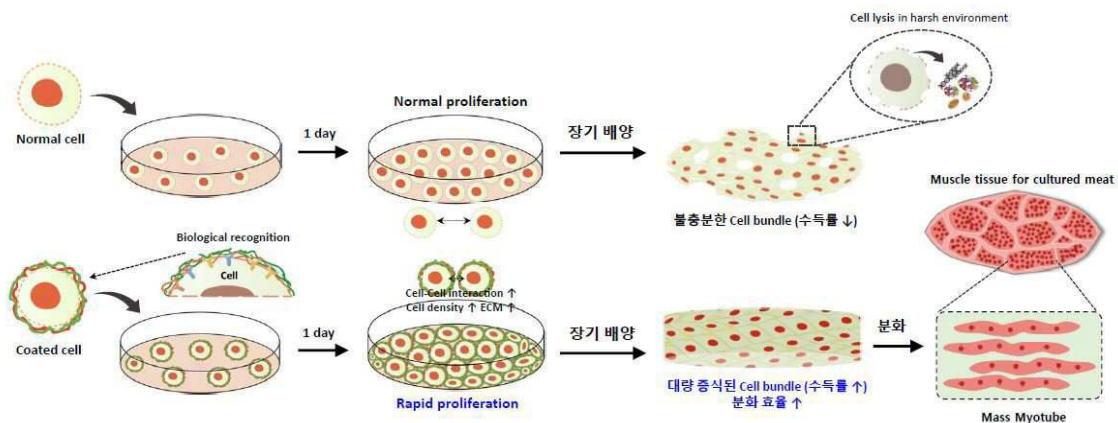
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 세포 코팅기술을 기반으로 한 배양육 제조방법 및 이로부터 제조된 배양육

(57) 요약

본 발명은 배양육 제조에 사용 가능한 세포 표면을 코팅하여 나노필름을 형성하는 단계; 상기 코팅된 세포를 배양하는 단계; 상기 배양된 세포의 분화를 유도하는 단계; 및 상기 분화된 세포로부터 근육 조직이 형성되는 단계;를 포함하는 배양육 제조방법 및 이로부터 제조된 배양육을 제공하고, 세포 보호 및 세포 접착력을 증가시킴에 따라 세포의 증식 및 분화 효율을 높여 세포의 대량 증식을 통한 배양육 제조에 최적화된 환경을 조성할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12M 21/08 (2013.01)

C12M 25/14 (2013.01)

C12M 35/02 (2013.01)

C12N 13/00 (2013.01)

C12N 2506/1323 (2013.01)

C12N 2533/54 (2013.01)

C12N 2533/80 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	20012384
과제번호	2021-11-1179
부처명	산업통상자원부
과제관리(전문)기관명	한국산업기술평가관리원
연구사업명	산업기술알키미스트프로젝트
연구과제명	세포기반 배양육 개발을 위한 대량생산 요소 신기술의 확립 및 신산업창출
기 여 율	1/1
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2021.05.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

배양육 제조에 사용 가능한 세포 표면을 코팅하여 나노필름을 형성하는 단계:

상기 코팅된 세포를 배양하는 단계;

상기 배양된 세포의 분화를 유도하는 단계; 및

상기 분화된 세포로부터 근육 조직이 형성되는 단계;를 포함하는, 배양육 제조방법.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 배양육 제조에 사용 가능한 세포는 중간엽 줄기세포(Mesenchymal stem cells: MSCs), 유도 만능 줄기세포(induced Pluripotent stem cells: iPSCs), 위성세포(Satellite cell), 지방세포(Adipocyte), 또는 배아 줄기세포(embryonic stem cell)인, 배양육 제조방법.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 코팅은 정전기적 인력, 반데르발스 힘, 소수성 결합, 수소결합, 및 공유결합으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상을 이용하여 다층 나노필름을 형성하는 것인, 배양육 제조방법.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 나노필름은 양전하성 물질 및 음전하성 물질이 교대로 적층되어 형성되는 것인, 배양육 제조방법.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 양전하성 물질 및 음전하성 물질은 가교결합을 형성하는, 배양육 제조방법.

청구항 6

제 4항에 있어서,

상기 양전하성 물질은 키토산, 녹말, 콜라겐, 젤라틴, 피브리노겐, 실크피브로인, 카제인, 엘라스틴, 라미닌, 및 피브로넥틴으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상인, 배양육 제조방법.

청구항 7

제 4항에 있어서,

상기 음전하성 물질은 히알루론산, 알지네이트, 펙틴, 타닌산, 리그닌, 셀룰로오스, 헤파린, 젤란검, 에스테르검, 카라기난, 한천, 잔탄검, 아라비아검, 글루코만난, 카르복시메틸셀룰로오스검(CMC), 구아검, 로커스트콩검, 타마린드검 및 타라검으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상인, 배양육 제조방법.

청구항 8

제 1항에 있어서,

상기 나노필름의 두께는 5 내지 5000 nm인, 배양육의 제조방법.

청구항 9

제 1항에 있어서,

상기 코팅된 세포는 스캐폴드 또는 생물반응기(Bioreactor) 내에서 배양되는 것인, 배양육의 제조방법.

청구항 10

제 1항에 있어서,

상기 코팅된 세포의 배양시 초음파, 전류, 전자기장, 자기장 또는 이들의 조합된 자극을 처리하는 배양육의 제조방법.

청구항 11

제 1항에 있어서,

상기 근육 조직에 지방 및 착색제를 첨가하는 단계;를 더 포함하는 배양육의 제조방법.

청구항 12

제 1항 내지 제 11항 중 어느 한 항에 따른 제조방법에 의하여 제조된 배양육.

청구항 13

제 12항에 있어서,

상기 배양육은 닭고기, 돼지고기, 소고기, 염소고기, 양고기, 오리고기 또는 어류를 대체하는 것인 배양육.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 세포 코팅기술을 기반으로 한 배양육 제조방법 및 이로부터 제조된 배양육에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 국제연합식량농업기구(FAO)의 보고에 의하면 세계 인구는 2018년 기준 76억명에서 2050년에는 95억명으로 증가할 것으로 전망하고 있다. 그러나 온난화와 같은 지구의 이상기후로 인해 작물의 수확량은 감소될 것으로 예상되는 반면, 사료용 곡물의 수요는 늘어 생산비가 오르고 생산면적이 줄어들게 되어 식량자원으로서 축산물은 고가의 먹거리가 될 것으로 보고 있다.

[0003] 축산물과 같은 동물유래 식품은 에너지와 생산 측면에서는 고가이긴 하나, 인간의 정상적인 성장과 건강에 필수적인 양질의 단백질과 미량영양소의 최상 공급원이기 때문에 인간의 영양확보에 직접적인 공헌을 해왔다. 특히, 필수아미노산은 체내에서 합성되지 않거나 합성이 되어도 양이 매우 적어 반드시 음식으로 섭취해야만 하는 영양분으로서, 2050년 동물유래 식품의 수요는 5.5억톤으로 현재의 2배에 도달할 것이라는 예측을 볼 때, 필수아미노산을 공급하기 위하여 필요한 단백질을 전통적인 축산물 생산방식으로 감당하기에는 한계가 있다.

[0004] 한편, 미래의 육류 부족 문제를 해결하기 위한 방안으로서 최근 배양육이 주목받고 있다. 배양육은 대체육이라고도 하며, 가축을 사육하는 과정을 거치지 않고, 연구실에서 살아 있는 동물의 세포를 배양하여 세포공학기술로 세포증식을 통해 얻게 되는 식용고기를 의미한다. 시험관에서 키운다는 의미로 in vitro meat 또는 lab-grown meat, 천연이 아닌 인간이 줄기세포를 이용하여 합성한다는 의미에서 artificial meat, 전통적인 사육시설이 아닌 청정한 생산시설에서 생산된다는 의미로 clean meat, 배양육을 이루는 근섬유를 배양한다는 의미에서 바이오인공근육(bio-artificial muscles: BAMs)이라고도 불린다.

[0005] 배양육에 대한 아이디어는 상당히 오래 전에 제기되었는데, 1932년 영국의 윈스턴 처칠(Winston Churchill) 총리는 ‘50년 후의 세계(Fifty Years Hence)’ 라는 책에서 ‘50년 후에는 닭의 가슴살이나 날개만을 먹기 위해 닭을 기르지 않아도 될 것이다. 대신 우리는 적절한 조건에서 닭의 한 부위만 별도로 배양할 수 있는 능력을 가지게 될 것이다’ 라고 한 바 있다. 이후, 1999년 ‘배양육의 대부’ 로 불리는 네덜란드 암스테르담 대학교의 빌렘 반 엘런(Willem van Eelen) 박사가 배양육에 대한 이론으로 국제 특허를 획득하였고, 2002년 금붕어에서 유래한

근육조직을 실험실의 페트리접시에서 배양시키는 것을 성공하였다.

[0006] 현재 주로 사용하고 있는 배양육 제조방법은 다음과 같다. 살아 있는 동물에서 조직을 채취한 뒤 조직에서 줄기세포를 분리한다. 이후 분리된 줄기세포를 실험실에서 근세포로 배양한 뒤, 수 주 동안 성장시키고, 근섬유 착색과 지방 혼합 등을 거쳐 배양육을 제조하게 된다. 이 때 배양방법으로 스캐폴드(scaffolds)를 사용하기도 하고, 자기조직화 기술을 사용하기도 한다.

[0007] 상당히 오래 전 배양육에 대한 아이디어가 시작되었음에도 불구하고, 배양육을 제조하기 위해서 살아있는 동물로부터 조직을 채취하여 이로부터 줄기세포를 분리하는 과정에서 여전히 동물을 도축해야 한다. 또한, 현재 배양육의 생산 기술은 살아 있는 세포로부터 채취한 줄기세포를 근세포로 배양시키는 과정에 오랜 시간이 소요되며, 이로 인해 배양육 생산 비용이 여전히 높은 수준으로 유지되고 있는 문제가 있다. 게다가 장기 배양 과정에서 세포의 증식 및 분화 효율이 감소되어, 결과적으로 배양육 세포의 수득률이 현저히 떨어지는 문제도 가지고 있다.

[0008] 이는 배양육의 상용화 및 대량생산을 막고 있는 중대한 기술적 과제로서, 배양육 기술의 실용화를 위해서는 조직배양 기술의 개발과 대량생산 기술의 확보가 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 미국등록특허 제7270829호 (2007.09.18.)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 상기 기술적 과제를 해결하기 위하여 안출된 것으로서, 살아있는 동물로부터 얻은 최소한의 줄기세포로 많은 세포 증식과 분화를 유도할 수 있는 배양육 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0011] 또한, 본 발명은 배양육 세포의 장기 배양시에도 세포의 부착력을 유지하고, 세포의 증식 및 분화 효율을 높게 유지하는 배양육 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0012] 또한, 본 발명은 세포 배양과정에서 세포를 보호하고, 세포에 지속적인 자극을 전달하여 세포 거동을 제어할 수 있는 배양육 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0013] 본 발명은 코팅에 의하여 세포 보호 효과 및 세포 물성을 조절함으로써 배양육 제조를 위한 세포의 대량 증식 및 분화에 최적화된 환경을 조성하는 것을 목적으로 한다.

[0014] 본 발명은 높은 세포의 증식 및 분화 효율에 따라 빠르고 저비용으로 생산될 수 있는 경제적인 배양육을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0015] 상술한 바와 같은 과제를 해결하기 위하여 본 발명에 따른 배양육 제조방법은 배양육 제조에 사용 가능한 세포 표면을 코팅하여 나노필름을 형성하는 단계; 상기 코팅된 세포를 배양하는 단계; 상기 배양된 세포의 분화를 유도하는 단계; 및 상기 분화된 세포로부터 근육 조직이 형성되는 단계;를 포함한다.

[0016] 본 발명의 일 양태에 따른 배양육 제조방법에 있어서, 배양육 제조에 사용 가능한 세포는 중간엽 줄기세포(Mesenchymal stem cells: MSCs), 유도 만능 줄기세포(induced Pluripotent stem cells: iPSCs), 위성세포(Satellite cell), 지방세포(Adipocyte), 또는 배아 줄기세포(embryonic stem cell)일 수 있다.

[0017] 본 발명의 일 양태에 따른 배양육 제조방법에 있어서, 코팅은 정전기적 인력, 반데르발스 힘, 소수성 결합, 수소결합 및 공유결합으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상을 이용하여 다층 나노필름을 형성하는 것일 수 있다.

[0018] 본 발명의 일 양태에 따른 배양육 제조방법에 있어서, 나노필름은 양전하성 물질 및 음전하성 물질이 교대로 적층되어 형성되는 것일 수 있다.

- [0019] 본 발명의 일 양태에 따른 배양육 제조방법에 있어서, 양전하성 물질은 키토산, 녹말, 콜라겐, 젤라틴, 피브리노젠, 실크피브로인, 카제인, 엘라스틴, 라미닌, 및 피브로넥틴으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상일 수 있다.
- [0020] 본 발명의 일 양태에 따른 배양육 제조방법에 있어서, 음전하성 물질은 히알루론산, 알지네이트, 펙틴, 타닌산, 리그닌, 셀룰로오스, 헤파린, 젤란검, 에스테르검, 카라기난, 한천, 잔탄검, 아라비아검, 글루코만난, 카르복시메틸셀룰로오스검(CMC), 구아검, 로커스트콩검, 타마린드검 및 타라검으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 일 양태에 따른 배양육 제조방법에 있어서, 나노필름의 두께는 5 내지 5000 nm일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 일 양태에 따른 배양육 제조방법에 있어서, 코팅된 세포는 스캐폴드 또는 생물반응기(Bioreactor) 내에서 배양되는 것일 수 있다.
- [0023] 본 발명의 일 양태에 따른 배양육 제조방법에 있어서, 상기 코팅된 세포의 배양시 초음파, 전류, 전자기장, 자기장 또는 이들의 조합된 자극을 처리할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 일 양태에 따른 배양육 제조방법에 있어서, 상기 근육 조직에 지방 및 착색제를 첨가하는 단계;를 더 포함할 수 있다.
- [0025] 또한 본 발명은 상술한 바와 같은 배양육 제조방법에 의하여 제조된 배양육을 제공한다.
- [0026] 본 발명의 일 양태에 따른 배양육은 닭고기, 돼지고기, 소고기, 염소고기, 양고기, 오리고기 또는 어류를 대체할 수 있다.

발명의 효과

- [0027] 본 발명에 따른 배양육 제조방법은 세포 표면 코팅을 통해, 외부 스트레스로부터 세포를 보호하고, 안정적인 세포 증식을 수행하여 배양육 제조에 최적화된 환경을 조성할 수 있다.
- [0028] 본 발명에 따른 배양육 제조방법은 세포 간 상호작용에 관여하는 캐드헤린(Cadherins) 등의 세포막 단백질을 안정화하여 세포간의 접착력을 강화시킬 수 있으며, 이는 근육 세포로의 분화 유도능력을 증진시키는 효과가 있다.
- [0029] 본 발명에 따른 배양육 제조방법은 세포에 지속적인 자극을 전달함에 따라 세포 거동을 제어할 수 있어, 대량 증식 및 분화를 통해 근육 세포를 높은 수율로 수득할 수 있다.
- [0030] 본 발명은 최소한의 줄기세포로부터 높은 세포의 증식 및 분화 효율에 따라 빠르고 저비용으로 생산되는 경제적인 배양육을 제공하는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

- [0031] 도 1은 본 발명의 비교예 1 및 실시예 1에 따른 배양육 제조방법 중 배양 과정을 도시한 것으로, 단일세포의 코팅 유무에 따른 증식 결과를 나타낸 비교 모식도이다.
- 도 2는 본 발명에 따른 세포의 양전하층 및 음전하층의 교대 적층 코팅과정을 나타낸 모식도이다.
- 도 3 (a)는 본 발명의 실시예 1-2에 따른 가교결합된 다공성 나노필름(X-linked (CHI/CMC))의 제조과정을 간략히 나타낸 모식도이다.
- 도 3 (b)는 본 발명의 실시예 1-3에 따른 배양육 제조용 세포배양 플랫폼 제조과정을 간략히 나타낸 모식도이다.
- 도 4 (a)는 본 발명의 실험예 1-1에 따른 가교결합된 다공성 나노필름(X-linked (CHI/CMC))의 FT-IR 스펙트럼 분석 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 4 (b)는 본 발명의 실험예 1-2에 따른 가교결합된 다공성 나노필름(X-linked (CHI/CMC)) 및 비가교결합된 다공성 나노필름의 AFM 이미지를 비교 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 5 (a)는 C-피코시아닌이 다공성 구조의 필름에 혼입된 형태 및 이의 공초점 현미경 이미지를 나타낸 것이다. 가교결합된 필름의 경우 C-피코시아닌의 혼입 후 뚜렷한 형광이미지를 확인할 수 있다.

도 5 (b)는 비가교결합된 필름, 가교결합된 필름 및 C-PC가 혼입된 SEM 이미지를 나타낸 것이다.

도 6 (a)는 본 발명의 일 실시예에 따라 인간섬유아세포(HDF)에 1 bilayer, 2 bilayer 및 3 bilayer를 코팅한 공초점 이미지를 나타낸 것이다.

도 6 (b)는 본 발명의 일 실시예에 따라 인간섬유아세포에 3 bilayer로 코팅하여 배양한 경우 및 비코팅한 경우의 세포 증식 결과를 비교하여 나타낸 그래프이다.

도 7은 본 발명의 실험예 2에 따른 세포 증식 결과를 나타낸 그래프이다.

도 8은 보호층이 있는 필름 및 보호층이 없는 필름에서 필름 내 C-피코시아닌의 방출 특성을 비교한 그래프이다.

도 9는 본 발명의 실험예 2에 따른 각 그룹의 세포 증식 형태를 나타낸 광학 현미경 이미지이다.

도 10은 본 발명의 실시예 2에 따라 제조된 배양육의 조리 전과 조리 후의 형태를 나타낸 이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0032] 이하 본 발명에 따른 배양육 제조방법 및 이로부터 제조된 배양육에 대하여 상세히 설명한다. 이때, 달리 정의되지 않는 한, 모든 기술적 용어 및 과학적 용어는 이 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 통상적으로 이해하고 있는 의미를 가지며, 본 발명의 설명에서 사용되는 용어는 단지 특정 실시예를 효과적으로 기술하기 위함이고, 본 발명을 제한하는 것으로 의도되지 않는다.
- [0033] 또한, 하기의 설명에서 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 공지 효과 및 구성에 대한 설명은 생략한다. 이하 명세서에서 특별한 언급 없이 사용된 단위는 중량을 기준으로 하며, 일 예로 % 또는 비의 단위는 중량% 또는 중량비를 의미한다.
- [0034] 또한, 본 발명의 구성 요소를 설명하는 데 있어서, 제1, 제2, 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.
- [0035] 또한 본 발명의 명세서에서 사용되는 단수 형태는 문맥에서 특별한 지시가 없는 한 복수 형태도 포함하는 것으로 의도될 수 있다.
- [0036] 이하는 본 발명에 따른 배양육 제조방법에 대하여 상세히 설명한다.
- [0037] 먼저 일반적으로 공지된 배양육 제조방법은 살아있는 동물에서 조직을 채취한 뒤 조직에서 근육 위성세포를 추출하고 분리하여 준비된 세포를 생물 반응기에 넣고, 증식시킨다. 그런 다음 증식된 세포는 스캐폴드로 옮겨지거나 자가 조립되어 분화 배지에서 근육 조직으로 분화될 수 있다. 그러나 이러한 과정은 실제로 공정이 복잡하고, 세포 성장을 위해 고가의 영양소 공급이 지속적으로 이루어져야 하기 때문에 높은 생산 비용으로 인해 상용화되기 쉽지 않다.
- [0038] 이에 대해 본 발명은 세포 성장 배지로 인한 생산 비용을 절감하고, 대량의 세포를 안정적으로 증식시킬 수 있는 단순한 공정을 포함하는 배양육 제조방법을 제공하고자 한다.
- [0039] 본 발명에 따른 배양육 제조방법은 배양육 제조에 사용 가능한 세포 표면을 코팅하여 나노필름을 형성하는 단계; 상기 코팅된 세포를 배양하는 단계; 상기 배양된 세포의 분화를 유도하는 단계; 및 상기 분화된 세포로부터 근육 조직이 형성되는 단계;를 포함한다. 배양육 제조에 사용 가능한 세포는 줄기세포로서 예를 들면, 중간엽 줄기세포(Mesenchymal stem cells: MSCs), 유도 만능 줄기세포(induced Pluripotent stem cells: iPSCs), 위성세포(Satellite cell), 지방유래 성체줄기세포(Adipose-derived stem cell: ASC), 또는 배아 줄기세포(embryonic stem cell)가 될 수 있다.
- [0040] 각 단계에 대하여 보다 구체적으로 설명하면 다음과 같다.
- [0041] 배양육 제조에 사용 가능한 줄기세포를 분리하여, 줄기세포 표면을 코팅하여 나노필름을 형성하는 단계는, 양전하성 물질을 포함한 용액 및 음전하성 물질을 포함한 용액을 교대로 처리하여, 양전하성 물질층 및 음전하성 물질층을 교대로 적층하는 것일 수 있다. 상기 코팅은 정전기적 인력, 반데르발스 힘, 수소결합, 공유결합, 및 공유결합으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상을 이용하며, 이를 통해 다층의 나노필름을 형성할 수 있다.

- [0042] 구체적으로 배양육 제조에 사용 가능한 세포를 2개의 상반되게 하전된, 양전하성 물질을 포함한 제1코팅용액 및 음전하성 물질을 포함한 제2코팅용액 내에 교번적으로 침지시키는 단계를 포함한다. 즉, 제1코팅용액에 상기 세포를 침지시켜 음전하를 띠고 있는 세포막 표면에 양전하층을 도입하고, 그 후 제2코팅용액에 침지시켜 양전하층 상에 음전하층을 적층함으로써, 상기 세포 표면상에 LbL(layer-by-layer) 조립이 수행되고, 이를 n 회 반복함에 따라 다층의 나노필름이 형성될 수 있다.
- [0043] 상기 양전하층 및 음전하층의 교차 결합을 통해 상반된 전하층이 정전기적 인력을 통해 안정하게 결합을 유지할 수 있고, 이러한 다층의 나노필름이 세포를 장기간 안정한 상태로 보호할 수 있다.
- [0044] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 제1코팅용액은 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Media)에 10% 소태아혈청(Fetal Bovine Serum:FBS) 및 양전하성 물질을 첨가하여 제조할 수 있으며, 제2코팅용액은 DMEM에 10% FBS 및 음전하성 물질을 첨가하여 제조할 수 있다. 이때, 양전하성 물질 또는 음전하성 물질은 0.01 내지 10 mg/ml, 바람직하게는 0.1 내지 5 mg/ml, 보다 바람직하게는 0.5 내지 3 mg/ml의 농도로 포함될 수 있다.
- [0045] 상기 제1코팅용액 또는 제2코팅용액은 세포 배양에 필요한 다수의 성장 인자, 예를 들어 상피세포성장인자(epidermal growth factor: EGF), 인슐린유사성장인자(Insulin like growth factor: IGF-1), 혈소판유래성장인자(Platelet-derived growth factor: PDGF), 전환성장인자 베타(Transforming growth factor-beta: TGF- β), 혈관내피세포성장인자(Vascular endothelial growth factor: VEGF), 백혈병억제인자(leukemia inhibitory factor: LIF), 또는 섬유아세포성장인자(basic fibroblast growth factor: bFGF) 등을 추가적으로 함유할 수 있다. 다만, 상기 배지는 DMEM외에 α -MEM Eagles's MEM, Iscove's MEM, 199 배지, CMRL 1066, RPMI 1640, F12, F10, Way-mouth's MB752/1 또는 McCoy's 5A를 사용 가능하다.
- [0046] 또한, 상기 배지는 FBS에 제한되지 않고, BCS(bovine calf serum)나 말 혈청(horse serum)을 첨가한 혈청 배지일 수 있고, 첨가제를 포함한 무혈청배지일 수 있다.
- [0047] 또는 동물 유래의 혈청을 대체할 수 있는 영양 성분을 포함한 혈청대체 배지일 수 있다.
- [0048] 동물 유래의 혈청을 대체할 수 있는 성분은 구체적으로 예를 들면, 미세조류 유래의 활성 성분일 수 있다. 보다 구체적으로는 C-피코시아닌일 수 있다. C-피코시아닌은 스피룰리나(*Spirulina platensis*)라는 다세포의 필라멘트 형태를 지닌 시아노박테리아에서 추출한 활성 성분으로서, 항산화, 항염증 효과 및 면역 기능의 향상과 같은 유익한 기능을 하는 것으로 알려져 있다. 상기 C-피코시아닌을 세포 성장 인자로 포함함으로써, 동물 유래의 혈청 사용을 현저히 줄일 수 있어 비용 효율적이며, 세포의 증식과 골수 조혈세포의 분화를 강화하여, 향상된 세포 증식 효과를 제공할 수 있다.
- [0049] 배양액의 구성 성분은 필요에 따라 조절될 수 있으므로 상술한 조성에 제한되지 않는다.
- [0050] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 나노필름의 두께는 5 내지 5000 nm의 범위일 수 있다. 나노필름의 두께는 원하는 용도에 따라 조절될 수 있는데, 조밀한 층이 세포 상에 형성됨에 따라 물질 확산의 장벽으로 작용하지 않도록 상기 범위인 것이 좋다. 종게는 10 내지 4000 nm, 보다 종게는 20 내지 2000 nm인 것이 세포의 성능을 유지하는 측면에서 바람직할 수 있다. 상기 나노필름은 2개 이상의 층(1 이상의 이중층)이며, 바람직하게는 4개 내지 40개의 층일 수 있다. 보다 바람직하게는 10개 내지 30개의 층일 수 있다.
- [0051] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 필요에 따라 상기 양전하층 도입 후, 다음 음전하층의 도입 사이 또는 음전하층 도입 후, 다음 양전하층의 도입 사이에 본 발명의 목적 달성을 저해하지 않는 범위에서 세척 과정을 더 포함할 수 있다. 세척 과정은 세포 표면 또는 전하층에 약한 결합으로 적층된 물질을 제거하기 위한 단계를 의미하는 것으로, 제1코팅용액 또는 제2코팅용액과 동일한 용매를 사용하여 수행될 수 있다. 구체적인 일 예로, DMEM에 10% FBS를 첨가한 것이 세정용액으로 사용될 수 있다. 상기 세척 과정을 통해 세포 표면상에 균일하고 빠른 코팅층 형성 효과가 달성된다.
- [0052] 상기 양전하성 물질 및 음전하성 물질은 배양육 제조를 위하여 식용가능하여야 하고, 생체친화적인 유기 고분자 또는 무기물인 것이 좋다.
- [0053] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 유기 고분자의 구체적인 예로서 양전하성 물질은 키토산, 키틴, 녹말, 콜라겐, 젤라틴, 피브리노겐, 실코피브로인, 카제인, 엘라스틴, 라미닌, 및 피브로넥틴으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상일 수 있다. 바람직하게는 키토산, 콜라겐, 젤라틴, 엘라스틴 또는 라미닌일 수 있으나, 양이온성 다당체 고분자라면 이에 특별히 제한되지 않는다. 음전하성 물질은 히알루론산, 알지네이트, 펙틴, 타닌산, 리그닌, 셀룰로오스, 헤파린, 젤란검, 에스테르검, 카라기난, 한천, 잔탄검, 아라비아검, 글루코만난, 카

르복시메틸셀룰로오스검(CMC), 구아검, 로커스트콩검, 타마린드검 및 타라검으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상일 수 있다. 바람직하게는 카르복시메틸셀룰로오스검(CMC), 카라기난, 잔탄검 또는 한천일 수 있으나, 혼합검류 또는 음이온성 다당체 고분자라면 이에 특별히 제한되지 않는다.

[0054] 도 3(a)을 참고하여, 나노필름이 형성되는 단계를 상세히 설명한다. 양전하성 다당류로서 키토산은 NH_2 작용기를 다수 포함하고, pH 4~5 수용액에서 NH_3^+ 로 되므로 양으로 하전된다. 음전하성 다당류로서 CMC는 COOH 작용기를 다수 포함하며, pH 4~5 수용액에서 COO^- 로 되므로, 음으로 하전된다. 이에 따라 키토산층 및 CMC층은 정전기적 상호작용에 따라 LbL 조립되어, 다층 나노필름을 형성할 수 있다.

[0055] 본 발명의 바람직한 구현예로서, 상기 다층 나노필름에 가교결합을 형성하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 가교결합은 가교제에 의하여 유도될 수 있으며, 가교제의 대표적인 일 예는 EDC(Ethyl(dimethylaminopropyl)carbodiimide)/NHS(Hydroxysuccinimide)일 수 있다. EDC/NHS 원리를 이용하여 CMC의 에스테르기 및 키토산의 아민기 사이에서 안정적인 아마이드 결합이 형성됨으로써 제1가교결합이 수행될 수 있다. 또는 글루타르알데히드를 이용하여 글루타르알데히드의 반응성 말단이 다당류의 수산기와 1차 아민기 사이에 공유결합을 형성하도록 유도하여, 다당류 사슬 사이에 제2가교결합을 더 수행할 수 있다. 상기 가교결합이 형성된 필름은 다층 기공이 있는 거친 형태의 구조를 나타내고, 이 경우 세포 성장 인자 등의 고분자 로딩 및 방출 거동이 더 활발하게 일어나는 이점을 제공할 수 있다.

[0056] 상기 가교결합은 다공성 필름 내 세포 성장 인자가 혼입되어 고정화되는 데 유효하게 작용할 수 있다. 구체적으로, 상기 세포 성장 인자가 음으로 하전된 경우 다공성 필름 내 아민기와 정전기적 상호작용을 할 수 있고, 세포 성장 인자 내의 작용기와 필름 내 다당류의 다양한 작용기와 수소 결합을 형성할 수 있다. 또는 추가로 가교제의 반응성 말단과 반응하여 필름에 고정화될 수 있다.

[0057] 본 발명은 세포 표면에 나노필름을 형성하는 단계 이후, 세포 성장 인자의 지속적인 방출을 유도하기 위해 보호층을 더 코팅할 수 있다. 상기 보호층은 나노필름 표면에 코팅되어, 나노필름 내부에 혼입된 세포 성장 인자의 방출이 점차적으로 진행될 수 있도록 세포 성장 인자의 운동성을 감소시키는 작용을 할 수 있다.

[0058] 도 8은 세포 성장 인자로서 선택된 C-피코시아닌의 방출 프로파일을 도시한 것이다. 보호층이 없는 필름(uncapped film)의 경우보다 보호층이 있는 필름(capped film)의 경우 초기의 빠른 확산이 저해되고, C-PC의 서방성 거동이 관찰되었다. 상기 보호층은 특별히 제한되는 것은 아니지만, 세포 성장 인자의 안정성을 높이기 위해 당 화합물인 것이 바람직하다. 비제한적인 일 예는 아가로스를 포함하는 것일 수 있다.

[0059] 또한 본 발명의 일 구현예에 있어서, 세포 표면에 상기 나노필름을 형성하는 단계 이후, 세포 성장 인자를 첨가하는 단계를 더 포함할 수 있다. 세포 성장 인자는 다공성 나노필름 내부에 혼입되어, 서서히 방출될 수 있다. 즉, 상기 세포 성장 인자는 다공성 나노필름 내부의 양전하성 물질 및 음전하성 물질과 정전기적 상호작용 또는 가교결합하여 고정화된다. 세포 표면에 상기와 같이 유기 고분자 기반의 나노필름을 형성하는 경우 세포를 외부 환경으로부터 보호하고, 세포에 지속적인 자극을 전달하여 세포 거동을 제어하는 기능을 효과적으로 수행할 수 있다.

[0060] 배양육 제조에 사용 가능한 줄기세포는 순차적으로 근아세포와 근육세포로 증식 및 분화 유도되고, 이는 근육 조직을 형성한다. 고기의 육질은 근육의 운동으로 형성되는 것이므로 살아있는 동물과 유사한 근육 조직의 구현이 필요하다. 이를 위하여 근섬유에 지속적인 물리적 자극을 처리하는 방법을 수행할 수 있다. 특히, 상기 세포 표면을 세포외 매트릭스(Extracellular matrix: ECM) 관련 고분자 소재로 코팅한 경우 세포에 지속적인 물리적 자극을 용이하게 전달하며, 근섬유의 단백질의 생성을 조절할 수 있다. 근섬유의 반복적인 당김과 풀림을 통하여, 콜라겐 생성이 증대되기도 하고 감소되기도 하는 것이다.

[0061] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 세포에 높은 강도를 부여할 수 있는 측면에서 필요에 따라 상기 무기물을 도입할 수 있다. 무기물의 구체적인 예를 들면, 인산칼슘($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), 탄산칼슘(CaCO_3), 염화나트륨(NaCl), 염화칼륨(KCl), 황산마그네슘(MgSO_4), 염화마그네슘(MgCl_2), 탄산수소나트륨(NaHCO_3), 염화칼슘(CaCl_2) 및 인산이수소칼륨(KH_2PO_4) 등일 수 있고, 생광물에 해당하는 것이면 이에 특별히 제한되지 않고 사용될 수 있다. 본 발명의 구체적인 일 예로서, 상기 음전하층이 적층된 후, 상기 무기물을 코팅하는 경우 표면 위 결정화가 수월하게 이루어질 수 있어 좋다. 이 경우 기계적 성질을 보완할 수 있어, 세포의 보호 효과가 현저히 우수해지며, 세포의 분열을 제어할 수 있다. 대량 증식 유도시, 산을 처리하여 무기물을 분해함으로써, 세포 분열 조절이 가능하다.

- [0062] 배양 형태는 당업계에 공지된 통상적인 2차원 또는 3차원적 배양일 수 있다. 다만, 세포와 세포간의 상호작용에 의한 실제 생체조직과 유사한 조직의 구현을 위하여 3차원적 배양이 바람직할 수 있다. 3차원적 배양의 구체적인 예를 들면, 3D 다공성 스캐폴드, 세포 자체 또는 셀 시트 기술을 통한 비스캐폴드 형태(scaffold-free platforms), 마이크로칩 내에 세포를 배치하는 방법, 하이드로겔을 이용한 방법, 생물반응기를 이용한 방법이 있다.
- [0063] 본 발명의 일 구현예에 따라 코팅된 세포는 스캐폴드 또는 생물반응기(Bioreactor) 내에서 배양되는 것일 수 있다. 생물반응기는 관류, 온도, 습도 및 가스 교환과 같은 요인을 국지적으로 제어하는 원통형 챔버로서, 세포는 생물반응기 내부의 발판에 배치되어 3D 배양이 촉진될 수 있다. 스캐폴드는 3차원 지지체로서 주어진 환경에서 생체의 세포외기질의 다양한 역할을 모방하여, 세포의 부착, 증식 및 분화에 참여하고 궁극적으로 조직에 합입된다. 일반적으로 하이드로겔로 구성되어 물리적으로 약할 수 있으나, 세포에 생물학적 환경을 제공할 수 있다.
- [0064] 구체적으로 상기 코팅된 줄기세포는 근아세포(myoblast)로 분화되고, 근아세포는 스캐폴드 또는 생물반응기 내에서 분주(seeding)되어 근육세포로 증식 및 분화과정을 거친다. 근아세포는 스캐폴드에 부착하여 성장하거나 생물반응기 내에서 자기조직화에 의하여 성장할 수 있다.
- [0065] 본 발명의 바람직한 일 구현예에 있어서, 코팅된 줄기세포는 스캐폴드에 분주되어 배양되는 것일 수 있다. 고정된 스캐폴드에 분주되거나, 코팅된 줄기세포 및 스캐폴드 재료를 먼저 혼합한 후, 3D 프린팅에 의해 스캐폴드가 제조와 세포의 증식이 동시에 이루어지는 형태일 수 있다. 본 발명에 따라 코팅된 줄기세포는 상기 3D 프린팅에 의해 세포에 닿는 물리적인 자극으로부터 세포 보호 효과가 우수하게 나타난다.
- [0066] 주로 뼈가 없이 사용되는 햄버거 패티나 소시지, 간고기(miced meat) 용도의 배양육 제조를 위해 상기 스캐폴드에 분주하여 배양할 수 있다. 혹은 스테이크 등 구조화된 육류를 수득하기 위해서는 자기조직화에 의한 성장을 거치는 것이 유리할 수 있다. 자기조직화는 줄기세포로부터 아주 조직화된 근조직 및 배양육이 스스로 제조되는 것을 지칭하거나 기존의 근육조직을 배양기 내에서 증식시킴으로써 배양육을 제조하는 것을 말한다.
- [0067] 스캐폴드 상에서 또는 생물반응기 내에서 배양된 근아세포는 근육세포로 분화되고, 근육 조직으로 성장한다. 이 과정은 초음파, 전류, 전자기장, 자기장 또는 이들의 조합된 자극을 세포에 처리하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 자극은 기계적 자극 또는 전기적 자극을 포함하는 물리적 자극으로서, 적절한 물리적 자극을 인가함으로써 순환기, 신경계, 근육 등의 다양한 자극이 존재하는 실제 체내와 유사한 환경을 조성할 수 있다. 이를 통해 세포 배양시 성장 촉진을 유도하며, 근육세포의 형태, 기능 및 발달이 조절될 수 있다.
- [0068] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 근육 조직에 지방 및 착색제를 첨가하는 단계;를 더 포함할 수 있다. 상기 지방은 따로 배양된 지방세포를 근육 조직에 주입하거나 근육 세포의 증식 과정에서 지방 세포를 주입하여 공동 배양(co-culture)하는 방식으로 지방 첨가가 이루어질 수 있다.
- [0069] 상기 공동배양의 구체적인 일 예로서, 지방전구세포 및 근육 세포를 젤라틴 또는 콜라겐 등의 스캐폴드 재료에 균일하게 혼합하고, 배지에 첨가하여 배양혼합액을 제조한다. 상기 배양혼합액은 3차원 세포-프린팅 시스템(3D cell-printing system)을 이용하여 층상으로(Layer-by-layer) 플로팅 되며, 이후 지방세포 및 근육 세포의 증식과 분화를 유도할 수 있다. 본 발명에 따른 코팅된 줄기세포는 상기 외부 자극에도 불구하고 안정하게 보호될 수 있고, 우수한 세포 접착력을 유지할 수 있어 대량 증식 및 분화가 유도된다. 지방세포 및 근육 세포의 공동 배양에 의하는 경우 별도의 지방 첨가 공정이 불필요하며, 지방세포 및 근육 세포의 상호작용에 따라 실제 근육 조직과 유사조직이 형성될 수 있으므로 육류의 맛이 한층 향상될 수 있는 장점이 있다.
- [0070] 또는 상기 근육 조직을 패티로 제조하는 경우에 액상의 지방을 넣어 혼합하는 방식으로 첨가될 수 있다. 이는 육류에 포함된 포화 지방산 대신 유익한 지방으로 대체할 수 있어 배양육의 장점으로 손꼽히기도 한다. 육류의 맛은 근육 사이의 지방에서 나오기 때문에 육류의 실제 맛에 가깝게 구현하기 위하여 대두유, 옥수수기름, 카놀라유, 미강유, 참기름, 추출참깨유, 들기름, 추출들깨유, 홍화유, 해바라기유, 목화씨기름, 땅콩기름, 올리브유, 팜유류, 야자류, 고추씨기름 등 식물성 유지류, 식용우지, 식용돈지, 원료우지, 원료돈지, 어유 등 동물성 유지류, 및 혼합식용유, 향미유, 가공유지, 쇼트닝, 마가린, 모조치즈, 식물성크림 등 식용유지가공품을 사용할 수 있다.
- [0071] 착색제는 식품에 색을 부여하는 화합물을 지칭하는데, 소고기 또는 돼지고기의 붉은 육색을 재현하기 위하여 인공 착색제, 천연 착색제, 천연 추출물 (예를 들어, 비트 루트(beet root) 추출물, 석류 열매 추출물, 체리 추출물, 당근 추출물, 적양배추 추출물, 홍조류(red seaweed) 추출물), 개질된 천연 추출물, 천연 즙 (예를 들어, 비트 루트 즙, 석류즙, 체리즙, 당근즙, 적양배추즙, 홍조류즙), 개질된 천연 즙, FD&C (Food Drug &

Cosmetics) 적색 3호 (에리스로신), FD&C 녹색 3호 (패스트 그린(fast green) FCF), FD&C 적색 40호 (알루라 레드(allura red) AC), FD&C 황색 5호 (타르타진(tartazine)), FD&C 황색 6호 (선셋 옐로(sunset yellow) FCF), FD&C 청색 1호 (브릴리언트 블루(brilliant blue) FCF), FD&C 청색 2호 (인디고틴(indigotine)), 산화티타늄, 아나토(annatto), 안토시아닌, 베타닌, 베타-APE 8 카로티날, 베타-카로틴, 블랙 커런트(black currant), 번트 슈가(burnt sugar), 칸타잔틴, 캐러멜, 카민/카민산, 코치닐 추출물, 커큐민, 루테인, 카로티노이드, 모나신(monascin), 파프리카, 리보플라빈, 사프란(saffron), 강황(turmeric), 및 이들의 조합을 사용할 수 있지만, 이에 특별히 제한되지 않는다. 추가적으로 아질산염과 같은 발색제 및 상기 아질산염의 발색을 촉진하는 아스코르브산, 에리소브르산 또는 이들의 염을 발색 보조제로 더 첨가할 수 있다.

[0072] 또한 추가적으로 지방의 산패, 색상 변화 또는 지방의 분리 등을 방지하기 위하여 단백질을 안정하기 위한 산화방지제, 유화제 염류 등을 첨가할 수 있다. 상기 산화방지제, 유화제 염류 등은 당업계에서 널리 이용되는 것이면 제한되지 않고 사용 가능하다.

[0073] 또한 본 발명은 상술한 배양육의 제조방법에 따라 제조된 배양육을 제공한다. 이때, 배양육은 닭고기, 돼지고기, 소고기, 염소고기, 양고기, 오리고기 또는 어류를 대체하는 것일 수 있다.

[0074] 이하, 실시예를 통해 본 발명에 따른 배양육 제조방법에 대하여 더욱 상세히 설명한다. 다만 하기 실시예는 본 발명을 상세히 설명하기 위한 하나의 참조일 뿐 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니며, 여러 형태로 구현될 수 있다.

[0075] [제조예 1] 배양육 제조용 세포배양 플랫폼 제조

[0076] 1-1. 다공성 나노필름 제조

[0077] 1 mg/ml 농도의 키토산 수용액(CHI, medium Mw, deacetylation = 75~85%, Sigma-Aldrich) 및 1 mg/ml 농도의 카르복실메틸셀룰로오스 나트륨염 수용액(CMC, Mw \approx 250,000, Sigma-Aldrich)을 준비하고, 1M HCl 및 NaOH를 사용하여 두 용액의 pH를 4로 조정하였다. 산소 플라즈마 처리된 기판(실리콘 웨이퍼, 슬라이드 유리 및 OHP 필름)을 CHI 용액에 10분 동안 담그고 기판 표면에 안정적인 양전하층을 형성하기 위해 탈이온수(DI water)로 기판을 두 번 세척하였다. 이어서, 양전하를 띤 기판을 음전하를 띤 CMC 용액에 10분간 침지한 후 동일한 방법으로 세척하였다. 이 과정에서 CHI와 CMC 사이의 정전기적 상호작용에 의해 기판 표면에 단일 이중층(BL) 필름이 형성되었다. 이 교차 증착을 n회 반복하여 n개의 BL로 구성된 (CHI/CMC) 필름을 제조하였다.

[0078] 1-2. 가교결합된 다공성 나노필름 제조

[0079] LbL 조립 후, 두 번 가교 반응을 도입하여 필름의 다공성 내부 구조를 얻었다. 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimide hydrochloride (EDC, Mw \approx 191.71, Daejung)/N-hydroxysulfosuccinimide (NHS, Mw \approx 115.09, Sigma-Aldrich) 화학을 1차 가교에 사용하였다. (CHI/CMC) 필름으로 코팅된 기판을 0.1 M EDC 및 2.5 mM NHS가 보충된 2-(N-모르폴리노) 에탄 설폰산 수화물(MES 완충액, Mw \approx 195.2, Sigma-Aldrich)의 0.05 M 용액에 20분 동안 담근 후, 인산염 완충 식염수(1X PBS Gibco® Life Technologies)와 탈이온수에 담가 미반응 잔류물을 세척하였다. 2차 가교를 위해 1차 가교가 완료된 기판을 2.5% 글루타르알데히드 용액(Mw \approx 25,000, Sigma-Aldrich)에서 30분 동안 인큐베이션한 후, 탈이온수로 철저히 세척하여, 가교결합된 다공성 나노필름(X-linked (CHI/CMC))을 완성하였다.

[0080] 1-3. 배양육 제조용 세포배양 플랫폼 제조

[0081] 1X PBS를 용매로 하여, 0.5 mg/mL의 농도로 C-피코시아닌(C-PC) 용액을 제조하였다. 가교결합된 다공성 나노필름으로 코팅된 기판을 C-PC 용액에서 12시간 동안 실온에서 빛이 차단된 환경에서 인큐베이션하여 C-PC가 필름에 충분히 혼입(incorporation)되도록 하였다. 필름이 건조되는 동안 아가로스를 0.1 w/v% 농도로 탈이온수에 용해시켰다. C-피코시아닌 보호층을 형성하기 위해 아가로스 용액을 cm^2 당 25 μl 로 건조된 필름에 적용하였다. 4 °C에서 준비된 필름을 경화시켜, 배양육 제조용 세포배양 플랫폼(capped (CHI/CMC)/CPC)을 완성하였다.

[0082] [실험예 1] 가교결합된 다공성 나노필름의 특성 평가

[0083] 1-1. 가교결합된 다공성 나노필름(X-linked (CHI/CMC))의 FT-IR 스펙트럼 분석

[0084] 푸리에 변환 적외선 분광법(FTIR; FT/IR-4700, Jasco, USA)을 사용하여 가교 전후의 필름의 정성 분석 및 추가

결합 형성을 조사하여, 도 4 (a)에 나타내었다.

[0085] (CHI/CMC)필름의 FT-IR 스펙트럼에서 COC, COH 및 CN에 해당하는 다당류 피크가 $1400\sim1630\text{ cm}^{-1}$ 사이에서 관찰되었으며, OH 및 NH에 대한 중첩 피크도 $3200\sim3500\text{ cm}^{-1}$ 사이에서 관찰되었다. 가교결합된 필름(X-linked (CHI/CMC))의 경우 비가교결합 필름(CHI/CMC)의 스펙트럼과 유사하지만 추가로 $\text{O}=\text{C}(1680\text{cm}^{-1})$ 및 $\text{NH}(1645\text{cm}^{-1})$ 결합 피크가 관찰된 것을 통하여, 가교결합에 의하여 아미드 결합이 형성된 것을 확인할 수 있었다.

[0086] 1-2. 가교결합된 다공성 나노필름(X-linked (CHI/CMC))의 AFM 이미지 분석

[0087] AFM으로 필름의 형태를 관찰하고 XEI 및 Gwyddion 소프트웨어를 사용하여 이미지를 분석하였다. 도 4 (b)에서 나타난 바와 같이, (CHI/CMC) 필름은 Rq 값이 6.13 nm인 비교적 조밀한 형태를 보인 반면, 가교결합된 필름(X-linked (CHI/CMC))은 Rq 값이 40.85 nm인 것으로 나타나 다공성이 현저히 증가한 형태를 보였다.

[0088] [실험예 2] 배양육 제조용 세포배양 플랫폼의 영양 전달의 효율성 평가

[0089] C-피코시아닌(C-PC)의 방출 실험

[0090] 실시예 1에 따라 제조된 필름 샘플을 OHP 기관에 코팅하고 세포 배양 플레이트에 적용한 후, 배양된 murine C2C12 근아세포(passage 10)를 $8\times10^3\text{ cells/well}$ 의 농도로 12웰 플레이트에 시딩하였다. 10% FBS를 함유하는 배양 배지 및 5% FBS를 함유하는 배양 배지를 각각 양성 및 음성 대조군으로 사용하고, C-PC를 사용하는 모든 그룹에는 5% FBS를 포함하는 배양 배지를 사용하였다.

[0091] ① C-PC가 없는 (CHI/CMC) 필름, ② 캡핑층이 없는 (CHI/CMC)/CPC 필름 그룹, ③ 캡핑층이 있는 (CHI/CMC)/CPC 필름 및 ④ 외인성 C-PC 그룹을 실험군으로 사용하였다. 외인성 C-PC 그룹은 두 개의 하위 그룹(Exo-CPC1 및 Exo-CPC2)으로 구분하여, Exo-CPC1의 경우, 5일 동안 캡핑된 필름에서 방출된 C-PC의 총량($93.22\text{ }\mu\text{g/ml}$)과 동일한 C-PC를 함유하는 배지를 사용하였다. Exo-CPC2의 경우 C-PC를 매일 첨가하는 배양 배지를 사용하였다. 이때 매일 첨가되는 C-PC의 양은 필름에서 방출된 C-PC의 총량을 일수로 나누어 계산하였다.

[0092] 3일차에는 실험군의 배지를 각 조건에 해당하는 배지로 새로 교체하였고, 필름은 교체되지 않았다. 총 5일 동안 인큐베이션한 후, 웰 내의 세포를 1X PBS 완충액으로 세척하고, 각 실험군에 따른 세포 증식 결과를 CCK-8 분석을 통해 분석하였다. 도 6에 도시된 바와 같이, C-PC를 포함한 모든 그룹이 FBS 5% 그룹(음성 대조군)보다 높은 세포 증식 정도를 보였다. 이는 C-PC가 감소된 FBS를 보충하여 세포 증식에 긍정적인 영향을 미쳤을 것으로 해석된다. ③ 캡핑층이 있는 (CHI/CMC)/CPC 필름에서의 세포 증식 정도는 FBS 10%(양성 대조군)군과 거의 유사하며, Exo-CPC2 군보다 약간 높게 나타나 실험군 중에서는 가장 높게 나타났다. Exo-CPC1 그룹과 Exo-CPC2 그룹의 경우 최종적으로는 동일한 양의 C-PC를 처리하였지만, Exo-CPC2 그룹의 세포 증식 속도는 Exo-CPC1 그룹보다 유의하게 높았다. 이러한 결과는 C-PC를 매일 처리함으로써 C-PC의 더 높은 활성과 주기적인 세포 자극에 기인한 것으로 보여진다.

표 1

	Initial	FBS 10%	FBS 5%	Uncapped	Capped film	Exo-1	Exo-2
Number of cells ($\times 10^4\text{ cells}$)	0.8	19.63 ± 1.61	3.2 ± 2.6	15.85 ± 2.36	19.68 ± 5.34	8.44 ± 0.83	15.72 ± 2.86
Expansion ratio	1	24.53	3.99	19.81	24.60	10.55	19.63

[0093]

[0094] 상기 표 1은 5일 동안 배양한 후 세포 수 및 확장 비율을 나타낸 결과이다. 초기 시딩 세포 수에 비하여 ③ 캡핑층이 있는 (CHI/CMC)/CPC 필름에서 약 24배의 세포 증식이 관찰되었다. 도 9에 나타난 광학현미경 이미지를 통해 확인할 수 있듯이, 음성 대조군 및 Exo-CPC1 그룹의 경우 다른 실험군에 비하여 세포 밀도가 상대적으로 낮았고, 대부분 융합되지 않은 근아세포의 형태로 존재하는 것이 관찰되었다. 그 외의 그룹은 포화되어 근관의 융합 형태가 관찰되었다.

[0095] **[실시예 1] 코팅한 줄기세포로부터 배양육 제조**

[0096] murine C2C12 근아세포를 준비하였다. DMEM(Thermo-Fischer, USA)에 키토산 수용액(Sigma aldrich, USA)을 첨가하여 1 mg/ml 농도의 제1코팅(키토산)용액을 제조하고 DMEM에 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨염 수용액(Sigma aldrich, USA)을 첨가하여 1 mg/ml 농도의 제2코팅(CMC)용액을 제조하였다. 근아세포를 0.5 ml의 제1코팅용액에 1분간 침지시켜 근아세포 표면에 키토산층을 형성하였다. 이후, 0.5 ml의 제2코팅용액에 1분간 침지시켜 키토산층 상에 음전하의 CMC층이 적층된 세포 표면을 형성하였다. 키토산 및 카르복시메틸셀룰로오스 간의 정전기적 인력, 수소결합 및 생물학적 상호인력(Biological interaction)을 기반으로 적층을 10회 반복함으로써 근아세포 표면에 키토산 및 카르복시메틸셀룰로오스 다층 나노필름이 코팅된 근아세포를 제조하였다. 키토산 및 카르복시메틸셀룰로오스가 포함되지 않은 DMEM을 세정용액으로 사용하였고, 코팅층 형성 후, 30초씩 세정용액에 침지시켜 세정과정을 거치도록 하였다. 또한 코팅 용액의 교체 및 세정 과정은 원심분리기를 사용하여 수행되었다.

[0097] 코팅된 근아세포는 5% FBS, 5% C-피코시아닌, 1% PS(Penicillin streptomycin)가 첨가된 DMEM 배지에 분주하여 12일간 증식시켜 근육 세포를 형성하였다. 증식된 세포를 2% 말혈청(horse serum)과 0.1% 인슐린(insulin)이 첨가된 DMEM 분화 배지에서 7일간 분화시켰으며 일정 간격으로 전기 자극을 주입하여 근섬유로의 분화를 촉진시켰다. 이어서 비트루트즘을 처리하여 근섬유를 착색시켜 배양육을 제조하였다.

[0098] **[비교예 1] 코팅하지 않은 줄기세포로부터 배양육 제조**

[0099] 실시예 1에서 murine의 근아세포를 키토산 및 CMC로 코팅하는 과정을 제외하고는 동일한 방법으로 배양육을 제조하였다.

[0100] 다만, 코팅하지 않은 줄기세포로부터는 장기 배양시 세포 번들이 충분히 생성되지 않았고, 외부 자극에 의하여 세포 사멸이 일부 나타나기도 하였다. 배양육 제조를 위한 다량의 근육 세포로 증식 및 분화에 6주 이상이 소요되었으며, 근섬유 전환이 제대로 이루어지지 않은 결과를 확인할 수 있었다.

[0101] **[실험예 3] 단일세포 코팅에 따른 증식 후 세포 밀도 및 분화 평가**

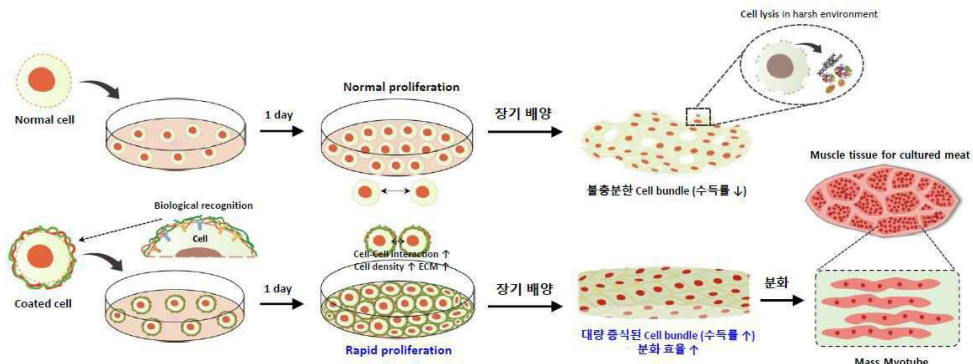
[0102] 트리크롬(Trichrome) 염색법을 이용하여 코팅하지 않은 단일세포(대조군)와 코팅된 단일세포의 증식 후, 세포 밀도 및 형성된 세포외기질을 정량 분석하였다. 미세 저울을 사용하여 대조군 대비 코팅된 단일세포의 무게 증가를 측정함으로써 세포 증식에 대한 코팅의 효과를 평가할 수 있다. 면역블로팅(Immunoblotting) 기법을 이용하여 근육세포의 증식 및 분화와 관련된 Pax7, 미오디(MyoD), 미오게닌(Myogenin) 등의 마커를 정량화함으로써 대조군과 코팅된 단일세포에서의 분화 정도를 평가하였다.

[0103] 다층 나노필름으로 코팅된 단일세포는 대조군 대비 세포의 증식 정도가 월등히 증가하였고, 세포 증식이 촉진됨에 따라 단일세포가 콘플루언시(confluency) 상태에 도달하는데 소요되는 시간이 훨씬 단축되었다. 이는 다층 나노필름이 세포의 신호 전달과 관련된 캐드헤린 단백질을 안정화하여 세포 간 접착력 강화로부터 비롯된 결과로 보여진다.

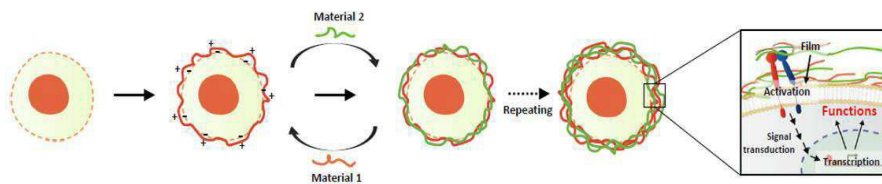
[0104] 이상을 통해 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 설명하였지만, 본 발명은 이에 한정되는 것은 아니고, 청구범위와 발명의 설명 및 첨부한 도면의 범위 안에서 여러 가지로 변형하여 실시하는 것이 가능하고, 이 또한 본 발명의 범위에 속하는 것은 당연하다.

도면

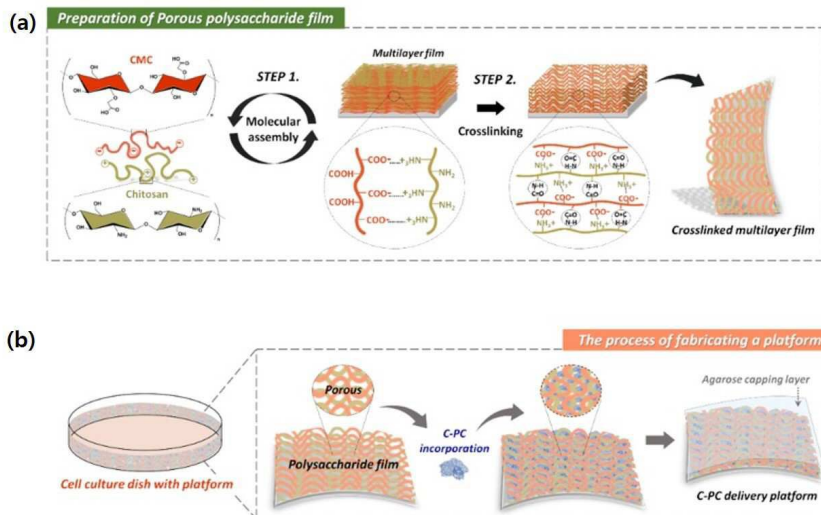
도면1



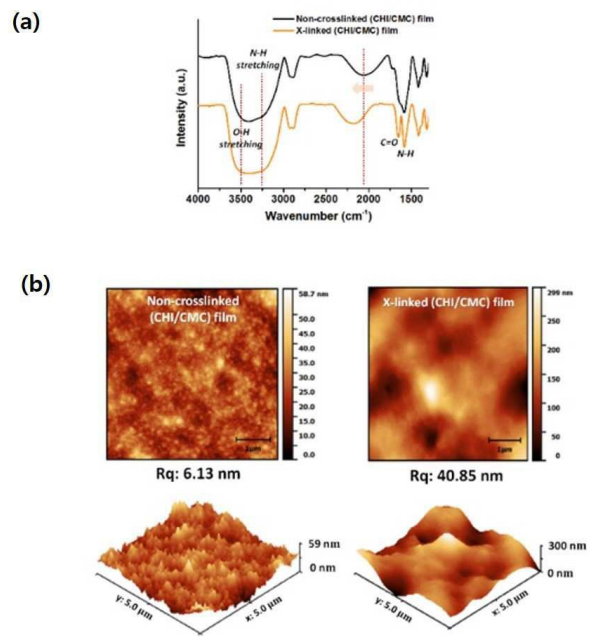
도면2



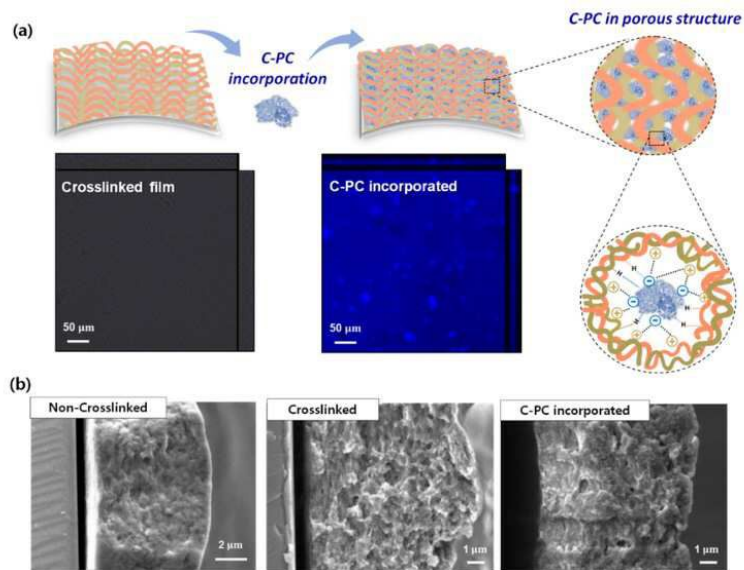
도면3



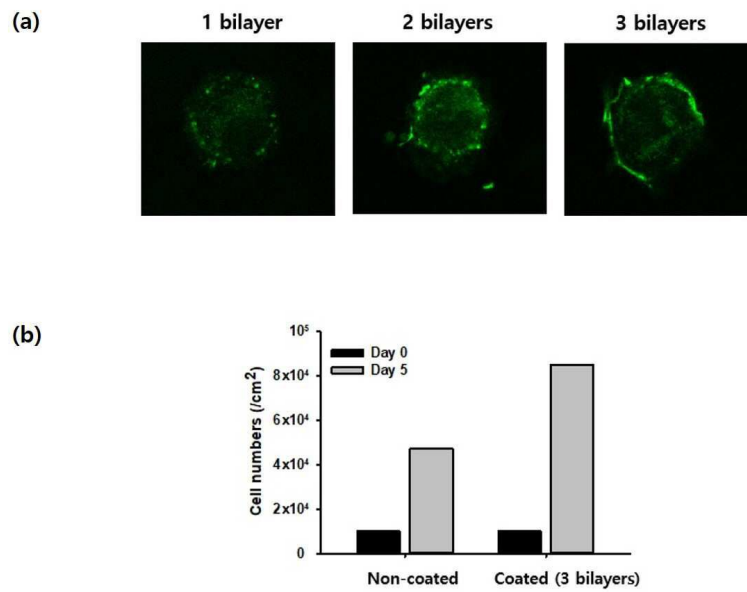
도면4



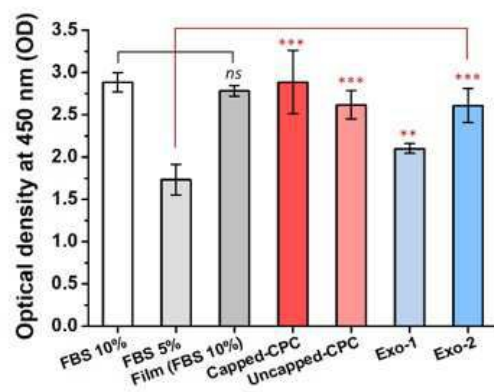
도면5



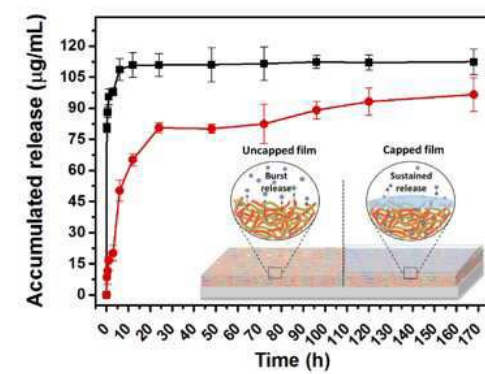
도면6



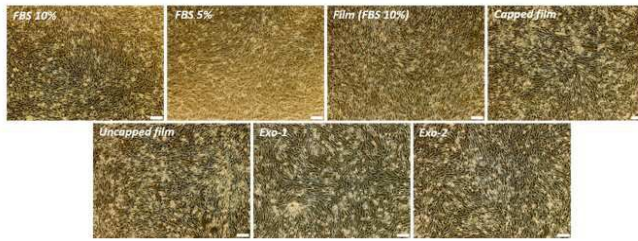
도면7



도면8



도면9



도면10

