(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0170449
(43) 공개일자 2024년12월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*A61L 27/56* (2006.01) *A61L 2/10* (2006.01)
*A61L 27/18* (2006.01) *A61L 27/20* (2006.01)
*A61L 27/36* (2006.01) *A61L 27/60* (2006.01)
(52) CPC특허분류
*A61L 27/56* (2013.01)
*A61L 2/10* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-0067110
(22) 출원일자 2024년05월23일
심사청구일자 2024년05월23일
(30) 우선권주장
1020230068591 2023년05월26일 대한민국(KR)

(71) 출원인
**슈펩 주식회사**
충청북도 청주시 청원구 오창읍 양청4길 45, 3층 에이304호 (충북대학교 융합기술원)
**이화여자대학교 산학협력단**
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
**홍익대학교 산학협력단**
서울특별시 마포구 와우산로 94 (상수동)
(72) 발명자
**이진규**
서울특별시 서초구 반포대로 275, 108동 1902호
**이남근**
서울특별시 강서구 공항대로2가길 33, 203호
*(뒷면에 계속)*
(74) 대리인
**특허법인더웨이브**

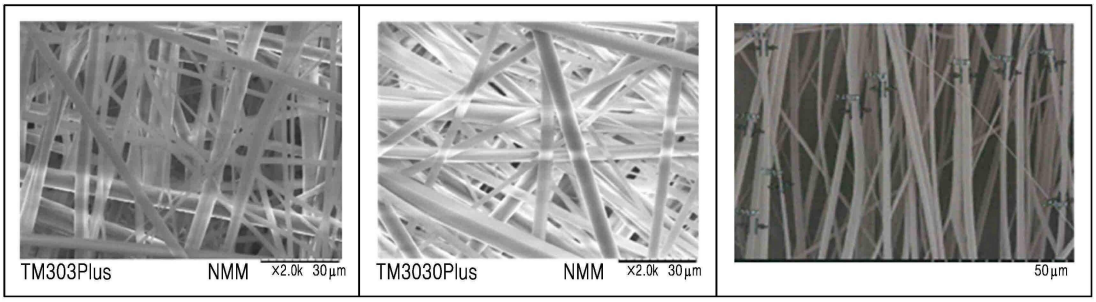
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **식품용 대체육 및 배양육 껍질 또는 인공 피부 제조를 위한 섬유형 스캐폴드, 그 제조 방법 및 이를 이용한 인공 피부 제조 방법**

## (57) 요 약

본 개시는 기계적 강도가 우수하면서, 세포-매개성 수축이 발생하지 않으며, 다루기 쉽고, 독성이 없는 식품 원료 성분으로 이루어진 식품용 대체육 및 배양육 껍질 또는 인공 피부 제조를 위한 섬유형 스캐폴드, 이의 제조 방법 및 이를 이용한 인공 피부 제조 방법을 제공하며, 스캐폴드는 다수의 섬유들의 적층으로 형성되며, 섬유는 탈수 축합 반응에 의해 가교된 식품 원료 성분이며 아미노기를 포함하는 섬유 형성 단백질 물질 및 식품 원료 성분이며 아미노 그룹을 포함하는 다당류 물질을 포함한다.

## 대 표 도




(a) (b) (c

(52) CPC특허분류
***A61L 27/18*** (2013.01)
***A61L 27/20*** (2013.01)
***A61L 27/3687*** (2013.01)
***A61L 27/60*** (2013.01)
*D10B 2509/06* (2013.01)
(72) 발명자
**성종환**
서울특별시 송파구 올림픽로 435, 116동 1201호
**김재정**
서울특별시 서초구 서초중앙로 220, 102동 302호
**오유림**
서울특별시 용산구 한강대로62길 45-25, 센트럴파크 203호

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

인공 피부 제조를 위한 스캐폴드에 있어서,

다수의 섬유들의 적층으로 형성되며,

상기 섬유는 탈수 축합 반응에 의해 가교된, 식품 원료 성분이며 아미노기를 포함하는 섬유 형성 단백질 물질 및 식품 원료 성분이며 아미노 그룹을 포함하는 다당류 물질을 포함하는, 스캐폴드.

### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 섬유는 상기 인공 피부와 접착력을 개선하기 위하여, 피부를 구성하는 단백질 물질을 더 포함하는, 스캐폴드.

### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 섬유는 가교제로 식품 원료 성분인 아스코르브산, 게니핀, 효소, 아미노산, 폴리페놀, 페놀산, 유기산, 리보플라빈 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹에서 선택한 하나 이상을 더 포함하는, 스캐폴드.

### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 섬유는 상기 섬유의 뭉침을 방지하는 가소제로 식품 원료 성분인 글리세롤을 더 포함하는, 스캐폴드.

### 청구항 5

제1항에 있어서,

상기 다수의 섬유들의 적층은,

일방향으로 연장된 상기 섬유들이 상기 일방향과 교차하는 타방향으로 나열되어 형성된 섬유 레이어가 복수개 적층되며, 제1 레이어의 섬유들의 연장 방향과 제2 레이어의 섬유들의 연장 방향은 서로 교차 또는 평행하게 배치되어 전체 스캐폴드 상에서 복수의 공극이 형성된, 스캐폴드.

### 청구항 6

식품 원료 성분이며 아미노기를 포함하는 섬유 형성 단백질 물질 및 식품 원료 성분이며 아미노 그룹을 포함하는 다당류 물질을 포함하는 섬유 용액을 제조하는 단계;

다공성 재질로 이루어져 제조된 섬유 용액을 토출하며 서로 마주보는 한 쌍의 작용면을 접촉한 후 멀어질 때 인장력에 의해 상기 섬유 용액으로부터 다수의 섬유들을 제조하며, 제조한 다수의 섬유들을 수집하여 적층 섬유 레이어를 제조하는 단계;

제조된 적층 섬유 레이어를 UV 처리하는 단계; 및

UV 처리된 적층 섬유 레이어를 열풍 건조하여 스캐폴드를 획득하는 단계;

를 포함하는, 스캐폴드 제조 방법.

### 청구항 7

제6항에 있어서,

섬유 용액을 제조하는 단계는,

제1온도에서 상기 섬유 형성 단백질 물질을 용해하여 제1 용액을 제조하는 단계; 및

제1온도 보다 낮은 제2온도에서 상기 제1 용액에 상기 아미노 그룹을 포함하는 단당류 물질 및 피부를 구성하는 단백질 물질을 첨가하여 용해하는 단계;

를 포함하는, 스캐폴드 제조 방법.

**청구항 8**

제7항에 있어서,

상기 열풍 건조하는 단계는,

상기 제1온도 보다 낮은 제3온도의 열풍 건조에 의해 상기 아미노 그룹을 포함하는 단당류 물질 및 상기 섬유 형성 단백질 물질을 탈수 축합 반응시켜 상기 스캐폴드를 획득하는 것인, 스캐폴드 제조 방법.

**청구항 9**

제6항에 있어서,

상기 섬유 용액을 제조하는 단계는

가교제로 식품 원료 성분인 아스코르브산, 게니핀, 효소, 아미노산, 폴리페놀, 페놀산, 유기산, 리보플라빈 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹에서 선택한 하나 이상을 더 추가하는, 스캐폴드 제조 방법.

**청구항 10**

제6항에 있어서,

상기 섬유 용액을 제조하는 단계는

가소제로 식품 원료 성분인 글리세롤을 더 추가하는, 스캐폴드 제조 방법.

**청구항 11**

식품 원료 성분이며 아미노기를 포함하는 섬유 형성 단백질 물질 및 식품 원료 성분이며 아미노 그룹을 포함하는 다당류 물질을 포함하는 섬유 용액을 제조하는 단계;

다공성 재질로 이루어져 제조된 섬유 용액을 토출하며 서로 마주보는 한 쌍의 작용면을 접촉한 후 멀어질 때 인장력에 의해 상기 섬유 용액으로부터 다수의 섬유들을 제조하며, 제조한 다수의 섬유들을 수집하여 적층 섬유 레이어를 제조하는 단계;

제조된 적층 섬유 레이어를 UV처리하는 단계;

UV 처리된 적층 섬유 레이어를 열풍 건조하여 스캐폴드를 획득하는 단계; 및

획득한 상기 스캐폴드 상에 세포 배양액을 추가하여 세포를 배양하는 단계;

를 더 포함하는, 스캐폴드를 이용한 인공 피부 제조 방법.

## *발명의 설명*

### *기 술 분 야*

[0001] 본 개시는 식품용 대체육 및 배양육 껍질 또는 인공 피부 제조를 위한 섬유형 스캐폴드, 그 제조 방법 및 이를 이용한 인공 피부 제조 방법에 관한 것으로서, 더욱 구체적으로는 수축을 방지하며, 기계적 강도가 향상된 섬유형 스캐폴드, 그 제조 방법 및 이를 이용한 인공 피부 제조 방법에 관한 것이다.

### *배 경 기 술*

[0002] 인공 피부 관련 연구는 초기 화상치료를 위해 시작되어, 최근에는 화장품 등의 동물대체시험법의 재료로 활용하기 위해 수행되고 있으며, 이를 넘어서 신약개발에 중요한 화합물의 독성검사법의 재료로 활용하기 위해서도 수

행되고 있다. 독성검사법의 재료로 인공 피부를 활용하기 위해서는 독성이 없는 소재로 인공 피부를 제조하는 것이 필요하며, 이에 대한 연구가 요구된다.

[0003] 한편, 인공 피부를 제조하기 위하여 한국공개특허 제10-2011-0032381호에 나타낸 바와 같이 타원형의 3차원 스페로이드, 구조체 없는 세포 응집체 또는 구조체 매트릭스를 이용하여 세포를 배양하는 방식을 사용하거나, 특수 조직배양 용기에 세포배양체를 이용하여 세포를 배양하는 방식을 활용해 왔다. 이러한 방식은 쥐 꼬리에서 유래하며 다공성을 가진 스폰지 구조의 콜라겐 수화겔(하이드로겔)을 지지체로 사용한다. 그러나 콜라겐 수화겔 지지체는 비싸고, 기계적 강도가 약하며, 세포-매개성 수축이 발생하고, 공기와 닿을 경우 건조하여 수축이 발생하며, 주로 얇은 두께의 인공 피부 제조만 가능한 문제가 있다.

[0004] 콜라겐 수화겔 지지체의 한계를 극복하기 위해, 합성 폴리머를 사용한 지지체의 개발도 시도되고 있다. 합성 폴리머를 사용한 지지체를 제조하는 방식은 고전압 전기장을 이용한 방사를 통해 지지체를 제조하므로, 에너지 소비가 높고, 방전이 발생하며, 방사가 불안정하고, 합성 소재가 아닌 열에 약한 소재를 사용하는 경우 소재가 열분해 되는 문제가 있다.

[0005] 한편, 인공 피부의 제조에 대한 요구와 이울러 식품용 대체육 및 배양육 껍질 제조 연구에 대한 필요성도 증가하고 있다. 식품용 대체육 및 배양육 껍질은 사람이나 동물이 섭취하는 것이므로 독성이 없는 푸드 그레이드(food grade)의 소재로 제조하는 것이 중요하며, 좋은 식감을 위하여 얇지 않은 두께 및 적절한 기계적 강도 또한 필요하다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0006] 본 개시는 이와 같은 한계를 해결하기 위한 것으로, 본 개시의 목적은 식품용 대체육 및 배양육 껍질 또는 인공 피부 제조를 위한 섬유형 스캐폴드, 그 제조 방법 및 이를 이용한 인공 피부 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0007] 본 개시에서 해결하고자 하는 과제는 상술한 바에 한정되지 않으며, 명세서 전체를 통해 도출되어야 할 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0008] 본 개시의 일측면에 의하면, 식품용 대체육 및 배양육 껍질 또는 인공 피부 제조를 위한 스캐폴드에 있어서, 다수의 섬유들의 적층으로 형성되며, 상기 섬유는 탈수 축합 반응에 의해 가교된, 식품 원료 성분이며 아미노기를 포함하는 섬유 형성 단백질 물질 및 식품 원료 성분이며 아미노 그룹을 포함하는 다당류 물질을 포함하는 스캐폴드를 개시한다.

[0009] 여기서, 상기 섬유는 상기 인공 피부와 접착력을 개선하기 위하여, 피부를 구성하는 단백질 물질을 더 포함할 수 있다.

[0010] 여기서, 상기 섬유는 가교제로 식품 원료 성분인 아스코르브산, 게니핀, 효소, 아미노산, 폴리페놀, 페놀산, 유기산, 리보플라빈 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹에서 선택한 하나 이상을 더 포함할 수 있다.

[0011] 여기서, 상기 섬유는 상기 섬유의 뭉침을 방지하는 가소제로 식품 원료 성분인 글리세롤을 더 포함할 수 있다.

[0012] 여기서, 상기 다수의 섬유들의 적층은, 일방향으로 연장된 상기 섬유들이 상기 일방향과 교차하는 타방향으로 나열되어 형성된 섬유 레이어가 복수개 적층되며, 제1 레이어의 섬유들의 연장 방향과 제2 레이어의 섬유들의 연장 방향은 서로 교차 또는 평행하게 배치되어 전체 스캐폴드 상에서 복수의 공극이 형성될 수 있다.

[0013] 본 개시의 다른 측면에 의하면, 식품 원료 성분이며 아미노기를 포함하는 섬유 형성 단백질 물질 및 식품 원료 성분이며 아미노 그룹을 포함하는 다당류 물질을 포함하는 섬유 용액을 제조하는 단계; 다공성 재질로 이루어져 제조된 섬유 용액을 토출하며 서로 마주보는 한 쌍의 작용면을 접촉한 후 멀어질 때 인장력에 의해 상기 섬유 용액으로부터 다수의 섬유들을 제조하며, 제조한 다수의 섬유들을 수집하여 적층 섬유 레이어를 제조하는 단계; 제조된 적층 섬유 레이어를 UV처리하는 단계; 및 UV 처리된 적층 섬유 레이어를 열풍 건조하여 스캐폴드를 획득하는 단계; 를 포함하는, 스캐폴드 제조 방법을 제공한다.

[0014] 여기서, 섬유 용액을 제조하는 단계는, 제1온도에서 상기 섬유 형성 단백질 물질을 용해하여 제1 용액을 제조하는 단계; 및 제1온도 보다 낮은 제2온도에서 상기 제1 용액에 상기 아미노 그룹을 포함하는 단당류 물질 및 피부를 구성하는 단백질 물질을 첨가하여 용해하는 단계; 를 포함할 수 있다.

[0015] 여기서, 상기 열풍 건조하는 단계는, 상기 제1온도 보다 낮은 제3온도의 열풍 건조에 의해 상기 아미노 그룹을 포함하는 단당류 물질 및 상기 섬유 형성 단백질 물질을 탈수 축합 반응시켜 상기 스캐폴드를 획득하는 것 일 수 있다.

[0016] 여기서, 상기 섬유 용액을 제조하는 단계는 가교제로 식품 원료 성분인 아스코르브산, 게니핀, 효소, 아미노산, 폴리페놀, 페놀산, 유기산, 리보플라빈 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹에서 선택한 하나 이상을 더 추가할 수 있다.

[0017] 여기서, 상기 섬유 용액을 제조하는 단계는 가소제로 식품 원료 성분인 글리세롤을 더 추가할 수 있다.

[0018] 본 개시의 또 다른 측면에 의하면, 식품 원료 성분이며 아미노기를 포함하는 섬유 형성 단백질 물질 및 식품 원료 성분이며 아미노 그룹을 포함하는 다당류 물질을 포함하는 섬유 용액을 제조하는 단계; 다공성 재질로 이루어져 제조된 섬유 용액을 토출하며 서로 마주보는 한 쌍의 작용면을 접촉한 후 멀어질 때 인장력에 의해 상기 섬유 용액으로부터 다수의 섬유들을 제조하며, 제조한 다수의 섬유들을 수집하여 적층 섬유 레이어를 제조하는 단계; 제조된 적층 섬유 레이어를 UV처리하는 단계; UV 처리된 적층 섬유 레이어를 열풍 건조하여 스캐폴드를 획득하는 단계; 및 획득한 상기 스캐폴드 상에 세포 배양액을 추가하여 세포를 배양하는 단계; 를 더 포함하는, 스캐폴드를 이용한 인공 피부 제조 방법을 제공한다.

## *발명의 효과*

[0019] 본 개시에 따르면, 기계적 강도가 우수하면서, 세포-매개성 수축이 발생하지 않으며, 다루기 쉽고, 독성이 없는 식품 원료 성분으로 이루어진 인공 피부 제조를 위한 섬유형 스캐폴드를 제공한다.

[0020] 또한, 본 개시에 따르면 저비용, 저에너지, 조작이 용이하면서 섬유 방향이나 다공성을 조절 가능하고, 소재에 손상을 주지 않으면서 빠르게 제작할 수 있는 인장 방사(tensile spinning) 방식의 인공 피부 제조를 위한 섬유형 스캐폴드의 제조 방법 및 이를 이용한 인공 피부 제조 방법을 제공한다.

[0021] 또한, 본 개시에 따르면 상술한 섬유형 스캐폴드를 이용하여 제조되어 영양분 및 배출물의 이송이 용이하여 확산도가 좋은 인공 피부를 제공한다.

## *도면의 간단한 설명*

[0022] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 섬유형 스캐폴드 제조 장치를 나타낸 개략도이다.

도 2는 도 1의 적층 섬유 레이어 제조부를 나타낸 개략도이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 의한 스캐폴드를 전자현미경으로 관찰한 사진들이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 의한 스캐폴드에 의한 섬유아세포 생존도를 나타낸 실험 결과이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 의한 스캐폴드의 확산도와 비교예의 확산도를 비교한 그래프이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 의한 스캐폴드의 수축 특성을 나타내기 위한 두께 변화 사진 및 그래프이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 의한 스캐폴드에서 피부 상피 세포가 분화됨을 검증하기 위한 사진이다. 도 8은 도 7의 사진을 공초점 현미경으로 재구성한 이미지들이다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0023] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다. 본 발명의 효과 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 도면과 함께 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 다양한 형태로 구현될 수 있다.

[0024] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예들을 상세히 설명하기로 하며, 도면을 참조하여 설명할 때 동일하거나 대응하는 구성 요소는 동일한 도면부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다.

[0025] 이하의 실시예에서, 제1, 제2 등의 용어는 한정적인 의미가 아니라 하나의 구성 요소를 다른 구성 요소와 구별하는 목적으로 사용되었다.

[0026] 이하의 실시예에서, 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다.

[0027] 이하의 실시예에서, 포함하다 또는 가지다 등의 용어는 명세서상에 기재된 특징, 또는 구성요소가 존재함을 의미하는 것이고, 하나 이상의 다른 특징들 또는 구성요소가 부가될 가능성을 미리 배제하는 것은 아니다.

[0028] 이하의 실시예에서, 막, 영역, 구성 요소 등의 부분이 다른 부분 위에 또는 상에 있다고 할 때, 다른 부분의 바로 위에 있는 경우뿐만 아니라, 그 중간에 다른 막, 영역, 구성 요소 등이 개재되어 있는 경우도 포함한다.

[0029] 도면에서는 설명의 편의를 위하여 구성 요소들이 그 크기가 과장 또는 축소될 수 있다. 예컨대, 도면에서 나타난 각 구성의 크기 및 두께는 설명의 편의를 위해 임의로 나타내었으므로, 본 발명이 반드시 도시된 바에 한정되지 않는다.

[0030] 이하의 실시예에서, x축, y축 및 z축은 직교 좌표계 상의 세 축으로 한정되지 않고, 이를 포함하는 넓은 의미로 해석될 수 있다. 예를 들어, x축, y축 및 z축은 서로 직교할 수도 있지만, 서로 직교하지 않는 서로 다른 방향을 지칭할 수도 있다.

[0031] 어떤 실시예가 달리 구현 가능한 경우에 특정한 제조 순서는 설명되는 순서와 다르게 수행될 수도 있다. 예를 들어, 연속하여 설명되는 두 단계가 실질적으로 동시에 수행될 수도 있고, 설명되는 순서와 반대의 순서로 진행될 수 있다.

[0032] 이하의 실시예에서, A,B,C 및 이들의 조합으로 이루어지는 그룹에서 선택한 하나 이상이라는 표현은 A,B,C 각각을 선택하는 것 외에도 A+B, A+C, B+C, A+B+C 등의 다양한 조합을 선택하는 것도 포함하는 표현이며, 아울러 선택한 A, B, C 외에도 D, E, F 등을 더 포함할 수 있는 개방형(open) 표현이다.

[0033] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 섬유형 스캐폴드 제조 장치를 나타낸 개략도이다. 도 2는 도 1의 적층 섬유 레이어 제조부(130)를 나타낸 개략도이다.

[0034] 도 1을 참조하면, 스캐폴드 제조 장치는 섬유 용액 제조부(110), 섬유 용액 공급부(120), 적층 섬유 레이어 제조부(130), UV(Ultraviolet light)부, 건조부 등을 포함할 수 있다. 여기서 스캐폴드(scaffold)는 세포의 체외 배양과 체내 이식이 가능하도록 만들어진 물리적 지지체, 운반체 또는 점착 기질을 의미하며, 본 발명에서는 스캐폴드를 이용하여 표피 및 진피를 포함한 인공 피부를 제조할 수 있으나, 이에 한정하지 않고 인공 피부 외에 식품용 대체육 및 배양육 껍질을 제조하기 위한 세포를 포함하여, 다양한 세포를 배양할 수 있다. 이하에서는 스캐폴드 제조 장치와 함께 스캐폴드 제조 방법을 설명하기로 한다. 스캐폴드 제조 장치의 각 구성부는 도시되지 않은 하나 또는 다수의 프로세서(processor)에 의해 동작 및 제어될 수 있음은 해당 분야의 기술자에게 자명하다.

[0035] 섬유 용액 제조부(110)는 식품 원료 성분이며 아미노기를 가진 섬유 형성 단백질 물질 및 식품 원료 성분이며 아미노 그룹(amino group, $-NH_2$)을 포함하는 다당류 물질을 포함하는 섬유 용액을 제조한다. 섬유 용액은 점도를 갖는 고분자 용액의 일종이며, 섬유는 이를 통해 제조된 일 방향으로 연장된 실 모양의 물질일 수 있다.

[0036] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 섬유 용액에 포함되는 모든 물질은 식품 원료 성분으로만 이루어진다. 식품 원료 성분이란 식품을 제조하거나 가공하는데 사용되는 원료로, 안전성이 보장된 원료이며, 본 명세서에서는 동물, 식물 또는 미생물로부터 추출하거나 추출 후 가공해서 얻으며, 식품의 원료로 사용할 수 있는 안전성 있는 성분으로 정의된다. 종래의 스캐폴드가 식품 원료 성분이 아닌 합성 화학 재료를 원료로 사용하는데 반면, 본 발명에 의한 스캐폴드는 식품 원료 성분을 바탕으로 제조함으로써 독성이 없고 안전성이 보장되기 때문에, 독성검사법의 재료로 활용되는 인공 피부를 만드는데 적합하다. 또한, 본 발명에 의한 스캐폴드는 식품 원료 성분을 바탕으로 제조함으로써 사람이나 동물이 섭취할 수 있기 때문에 식품으로 활용되는 식품용 대체육 및 배양육 껍질을 만드는데도 적합하다. 이하에서는 인공 피부 제조를 위한 내용을 위주로 설명하겠으나, 해당 내용이 식품용 대체육 및 배양육 껍질에 동일하게 적용될 수 있다.

[0037] 식품 원료 성분이며 아미노기를 가진 섬유 형성 단백질 물질은, 예를 들어 젤라틴(Gelatine), 알부민(Albumin), 프롤라민(Prolamin), 감마폴리글루탐산(γ-Polyglutamic Acid) 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹에서 선택된 적어도 하나일 수 있으며, 유리하게는 젤라틴일 수 있다. 젤라틴은 닭, 소, 돼지와 같은 동물의 결절에서 추출되어 정제된 것일 수 있고, 알부민은 달걀에서 추출된 것일 수 있다. 프롤라민은 식물의 배유(胚乳)에 존재하는 단백질을 통칭하는 것으로, 밀로부터 추출하여 얻은 글리아딘(Gliadin), 보리로부터 추출하여 얻은 호르데인(Hordein), 옥수수로부터 추출하여 얻은 제인(Zein) 등을 포함할 수 있다. 감마폴리글루탐산은 클루탐산 중합체이며, 콩을 발효하는 과정에서 얻을 수 있는 물질로 점액 성분을 포함한다. 이하에서는 식품 원료 성분이며 아미노기를 가진 섬유 형성 단백질 물질이 젤라틴인 경우를 예로 들어 설명한다.

[0038] 식품 원료 성분이며 아미노 그룹(amino group, $-NH_2$)을 포함하는 다당류 물질은, 키토산(Chitosan) 일 수 있으며, 키토산은 갑각류의 껍질 등에서 추출하여 가공한 것일 수 있다. 이하에서는 식품 원료 성분이며 아미노 그룹(amino group, $-NH_2$)을 포함하는 다당류 물질이 키토산인 경우를 예로 들어 설명한다.

[0039] 섬유 용액 제조부(110)는 제1온도에서 섬유 형성 단백질 물질 (예를 들어, 젤라틴)을 용해하여 제1 용액을 제조한다. 제1 용액에는 용해된 젤라틴 외에도 가소제(plasticizer) 및 가교제(cross linker)가 더 포함될 수 있다.

[0040] 일 실시예에 의하면 가소제는 젤라틴에 포함되어 양극성을 가지는 단백질 성분에 서로 바인딩 되어 이후 섬유가 뭉치는 문제를 방지한다. 가소제는 글리세롤(Glycerol), 당알콜인 소르비톨(Sorbitol), 프로필렌글리콜(Propylene Glycol)및 이들의 조합으로 이루어진 그룹에서 선택된 하나일 수 있으며, 바람직하게 식품 원료 성분인 글리세롤일 수 있다. 여기서, 글리세롤은 코코넛 오일, 올리브 오일, 또는 팜 오일 등의 식물성 오일을 원료로 하여 추출되거나 동물 지방이나 기름에서 추출된 천연 글리세롤, 또는 식물성 오일이나 동물 지방에서 파생된 성분의 화학적 반응을 통해 생성된 합성 글리세롤을 사용할 수 있다.

[0041] 일 실시예에 의하면 가교제는 섬유 용액에 포함된 젤라틴과 키토산을 가교 결합 시키기 위한 것으로, 비타민 C로 알려진 아스코르브산(Ascorbic acid), 식물인 치자(Gardenia Jasminoides)에서 추출되는 게니핀(Genipin), 효소(enzyme), 아미노산(amino acid), 식물에서 추출되는 폴리페놀(Polyphenol), 폴리페놀의 하위 그룹인 페놀산(Phenolic Acid), 식물이나 동물에서 추출되는 유기산(Organic Acid) 및 비타민 B2로 알려진 리보플라빈(Riboflavin) 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹에서 선택한 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0042] 일 실시예에 의하면 젤라틴, 가소제 및 가교제에 용매를 첨가하여 젤라틴을 용해하여 제1 용액을 제조할 수 있다. 젤라틴은 수용성 물질이므로 용매는 물일 수 있다. 젤라틴, 가소제 및 가교제는 동시에 용해되어 제1 용액을 제조할 수 있으나, 본 발명은 이에 한정되지 않고, 젤라틴을 용해한 이후에 가소제 및 가교제를 첨가할 수도 있다. 제1 용액에는 가소제 및 가교제 이외에도 피부를 구성하는 물질에 대응하는 단백질의 일종인 엘라스틴(Elastin), 다당류의 일종인 히알루론산(Hyaluronic Acid), 탄산과 금속 또는 알칼리 금속 염인 탄산염(Carbonate) 등과 같은 다른 식품 원료 성분이 더 추가될 수 있다.

[0043] 여기서 제1온도는 섭씨 약 90도 내지 섭씨 100도일 수 있으며, 섭씨 90도 미만에서는 젤라틴과 가소제 및 가교제가 혼합물의 형태로 용해되지 않고, 섭씨 100도 초과에서는 젤라틴을 비롯한 가소제나 가교제 성분이 열손상을 받을 수 있다.

[0044] 다음으로 섬유 용액 제조부(110)는 제1온도 보다 낮은 제2온도에서 제1 용액에 식품 원료 성분이며 아미노 그룹($-NH_2$)을 가진 다당류 물질 및 피부를 구성하는 단백질 물질을 첨가하여 용해함으로써, 섬유 용액을 제조 할 수 있다.

[0045] 식품 원료 성분이며 아미노 그룹($-NH_2$)을 가진 다당류 물질 키토산일 수 있으며, 키토산의 아미노 그룹($-NH_2$)와 젤라틴의 카복실 그룹(Carboxyl group, -COOH)의 아민 카르보닐 반응을 바탕으로 하는 탈수 축합 반응에 의해 가교(crosslink)를 형성할 수 있도록, 도 1의 제조 장치에 의해 섬유 용액이 기계적 강도 및 생체 적합성을 가질 수 있게 섬유 형태로 방사한다. 키토산은 식품 원료 성분 즉 푸드 그레이드(food grade)에 해당한다면 어느 것이든 사용 가능하다.

[0046] 키토산은 불용성 물질이므로, 키토산과 함께 산성 용액을 첨가하여 섬유 용액을 제조할 수 있다. 산성 용액은 식품 원료 성분이며, 예를 들어 카복실산인 초산(Formic Acid), 유기산인 빙초산(Citric Acid), 아세트산인 식초(Vinegar), 유기산인 말산(Malic Acid), 아세트산과 수소과산화물의 혼합물인 과산화초산(Peracetic Acid 또는 Peroxyacetic Acid) 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹에서 선택한 하나 이상을 물에 희석한 용액을 포함할 수 있다. 산성 용액은, 산성 환경을 제공하여 키토산과 젤라틴의 탈수 축합 반응을 가속화하고, 키토산과 가교된 젤라틴이 인장력 및 신장력을 가지는 섬유의 형태로 방사가 가능하게 할 수 있다.

[0047] 섬유 용액에 포함된 젤라틴에 대한 키토산(Chitosan)의 무게(g) 비율은 젤라틴 1을 기준으로 키토산 약 0.050 내지 0.5의 무게 비율일 수 있으며, 유리하게는 젤라틴 1을 기준으로 키토산 무게 비율이 0.25 일 수 있다. 젤라틴을 기준으로 키토산 무게 비율이 0.050 미만인 경우에는 가교 결합이 충분히 이루어지지 않으며, 젤라틴을 기준으로 키토산 무게 비율이 0.5 초과인 경우에는 활성 세포(human foreskin fibroblasts)의 강성도 및 영률 특성에 적합하지 않아 이후 제대로 된 인공 피부를 제조할 수 없다.

[0048] 피부를 구성하는 단백질 물질은 콜라겐(Collagen) 일 수 있다. 콜라겐은 1형 콜라겐일 수 있으며, 예를 들어, 소나 돼지의 피부, 어류의 비늘, 닭이나 돼지의 발톱과 같은 동물 원료로부터 추출되어 산화적 방법, 효소 분해 방법, 산화 염기 처리법이나 육질 처리법에 의해 얻어진 식품 원료 성분일 수 있다. 콜라겐은 피부의 약 70%를 구성하는 물질이며, 특히 진피의 약 90%는 콜라겐으로 구성되어 구조적인 지지체로 작용하므로, 스캐폴드에 콜라겐이 포함됨으로써, 세포 배양의 기저층에 콜라겐이 포함되어 피부의 섬유조직을 만드는 섬유아세포(fibroblast)가 스캐폴드에 부착하는데 도움을 줄 수 있다.

[0049] 섬유 용액은 제1온도보다 낮은 제2온도에서 제조될 수 있다. 제2온도는 섭씨 약 35도 내지 50도일 수 있으며, 섭씨 35도 미만에서는 섬유 용액의 점도가 너무 높아져 섬유화가 어려운 문제가 있으며, 섭씨 50도 초과에서는 콜라겐이 파괴되는 문제가 있다.

[0050] 키토산, 콜라겐 및 산성 용액은 제1 용액에 동시에 첨가될 수 있으나, 본 발명은 이에 한정되지 않고, 소정의 순서에 따라 키토산, 콜라겐 및 산성 용액을 제1 용액에 첨가할 수 있다. 일 실시예에서 키토산, 콜라겐 및 산성 용액은 순차적으로 시간 간격을 두고 제1 용액에 첨가될 수 있으며, 다른 실시예에서 초산과 키토산이 동시에 제1 용액에 첨가되어 제2 용액을 제조되고, 제2 용액에 콜라겐을 첨가하여 섬유 용액을 제조할 수 있으며, 또 다른 실시예에서 초산과 콜라겐이 제1 용액에 동시에 첨가되어 제2 용액이 제조되고, 제2 용액에 키토산을 첨가하여 섬유 용액을 제조할 수도 있다.

[0051] <섬유 용액의 구성>

[0052] 본 발명의 일 실시예에 의한 스캐폴드를 제조하기 위한 섬유 용액은 식품 원료 성분으로만 이루어지는 것을 특징으로 한다. 일 실시예에서 섬유 용액은 약 10 내지 20 중량부의 젤라틴, 약 1 내지 10 중량부의 가소제, 약 0.01 내지 0.1 중량부의 가교제, 약 0.1 내지 1.0 중량부의 콜라겐, 약 1 내지 5 중량부의 키토산, 약 40 내지 60 중량부의 초산 및 약 30 내지 35 중량부의 물을 포함할 수 있다.

[0053] 여기서 젤라틴이 10 중량부 미만인 경우 섬유 형성 성분이 부족하여 섬유 형성이 어려울 수 있으며, 젤라틴이 20 중량부 초과인 경우 점도가 너무 높이 섬유화가 어려운 문제가 있다.

[0054] 여기서 가소제가 1 중량부 미만인 경우 젤라틴에 포함되어 양극성을 가지는 단백질 성분에 서로 바인딩 되어 이후 섬유가 뭉치는 문제가 발생하며, 가소제가 10 중량부 초과인 경우 섬유화가 어려운 문제가 있다.

[0055] 여기서 가교제가 0.01 중량부 미만인 경우 젤라틴과 키토산을 가교 결합이 충분하지 않게 되며, 가교제가 0.1 중량부 초과인 경우 섬유가 뭉치는 문제가 발생한다.

[0056] 여기서 콜라겐이 0.1 중량부 미만인 경우 피부의 섬유조직을 만드는 섬유아세포(fibroblast)가 섬유 용액으로 제조된 스캐폴드에 부착하기 어려우며, 콜라겐이 1.0 초과인 경우 섬유 용액의 섬유화가 어려울 수 있다.

[0057] 여기서 키토산이 1 중량부 미만인 경우 가교 결합이 충분히 이루어지지 않으며, 키토산이 5 중량부 초과인 경우에는 활성 세포(human foreskin fibroblasts)의 강성도 및 영률 특성에 적합하지 않아 이후 제대로 된 인공 피부를 제조할 수 없다.

[0058] 여기서 초산이 40 중량부 미만인 경우 산성 환경이 충분하지 않아 키토산과 젤라틴의 탈수 축합 반응이 잘 일어나지 않으며, 초산이 60 중량부 초과인 경우 과도한 산성 환경으로 다른 성분들이 변성될 우려가 있다.

[0059] 여기서 물이 30 중량부 미만인 경우 섬유 용액의 점도가 너무 높아 섬유화가 어려우며, 물이 35 중량부 초과인 경우 점도가 너무 낮아 섬유화가 어렵다.

[0060] 섬유 용액 공급부(120)는 제조된 섬유 용액을 수용하고 적층 섬유 레이어 제조부(130)로 섬유 용액을 공급한다.

[0061] 적층 섬유 레이어 제조부(130)는 섬유 제조기(131)와 섬유 수집기(132)를 포함하는데, 섬유 제조기(131)는 인장방사(tensile spinning) 방식에 의해 섬유 용액으로부터 섬유를 제조한다. 섬유 제조기(131)는 한 쌍의 서로 마주보는 작용유닛(131a, 131b)을 포함할 수 있고 각각의 작용유닛(131a, 131b)에는 사로 마주보는 작용면(1311a, 1311b)이 각각 구비된다. 섬유 제조기(131)는 마주보는 한 쌍의 작용면(1311a, 1311b)에 대하여 제1방향(x방향)으로 반복 이동 하면서 한 쌍의 작용면(1311a, 1311b)이 접촉과 이격을 반복하도록 작용유닛들(131a, 131b)을 구동한다. 작용유닛들(131a, 131b) 중 적어도 어느 하나는 섬유 용액 공급부(120)로부터 섬유 용액을 공급받을 수 있다. 작용면들(1311a, 1311b)은 다공성 재질로 이루어져 수용된 섬유 용액을 토출할 수 있다. 작용면들(1311a, 1311b)이 서로 접촉하는 경우 그 사이에 섬유 용액이 개재되고, 작용면들(1311a, 1311b)이 서로 이격되면 작용면 사이에 인장력에 의하여 점성이 있는 섬유 용액으로부터 복수의 섬유(F)들이 제조된다.

[0062] 섬유 수집기(132)는 제조된 섬유(F)를 레이어 형태로 수집한다. 섬유 수집기(132)는 일단에 섬유들이 안착되는 수집면(132c)을 가지며, 수집면(132c)은 하부의 피스톤 또는 모터(132m)에 의해 제1방향과 교차하는 제2방향(z 방향)에서 일정 거리만큼 반복 이동 운동을 한다. 예를 들어, 반복 이동 운동은 작용면들(1311a, 1311b)이 서로 접촉하는 경우 접촉된 작용유닛들(131a, 131b)과 멀어지는 방향으로 이동하고, 작용면들(1311a, 1311b)이 서로 이격되는 경우 제조된 섬유와 가까워지는 방향으로 이동하는 것이다. 섬유 수집기(132)는 작용면들(1311a, 1311b) 사이의 공간에 제조된 섬유들이 수집면(132c)에 안착되도록 한다.

[0063] 섬유 제조기(131)와 섬유 수집기(132)는 섬유(F)를 제조하는 동작 및 섬유(F)를 수집하는 동작을 반복하여 수행함으로써, 적층 섬유 레이어들을 획득한다. 동작은 소정의 횟수 만큼 원하는 두께의 적층 섬유 레이어를 얻기 위하여 반복할 수 있다.

[0064] <적층 섬유 레이어를 획득하기 위한 조건>

[0065] 섬유 용액으로부터 적층 섬유 레이어들은 약 20% 내지 50% 의 습도, 섭씨 약 18도 내지 30 도의 온도에서 획득될 수 있다. 유리하게는 40%의 습도 및 섭씨 24도의 온도에서 획득될 수 있다. 습도가 20% 미만인 경우 방사되어 적층된 섬유들 사이의 분리 현상이 발생하는 문제가 있으며 습도가 50% 초과인 경우 섬유가 늘어지고 생성된 섬유들끼리 결착되어 필름화 현상이 일어나는 문제가 발생할 수 있다. 온도가 섭씨 18도 미만이면 섬유 용액의 경화가 발생하는 문제가 있으며 섭씨 30도 초과이면 빠른 수분 증발로 적층 되는 섬유들 사이에 분리 현상이 발생하는 문제가 있다.

[0066] 섬유 수집기(132)는 수집면(132c)과 평행하게 연장되는 평면(xy평면)에서 시계방향 또는 시계반대 방향으로 수집면을 회전할 수 있다. 회전하는 수집면(132c)에 의하여, 레이어 별로 섬유들의 연장 방향이 서로 같거나 다른 적층된 섬유 레이어를 제조할 수 있으며, 각 레이어의 섬유 연장 방향을 다르게 제어함으로써, 적층 섬유 레이어의 공극 크기나 공극률을 제어할 수 있는 효과가 있다.

[0067] 종래의 고압의 전기장을 이용하여 섬유를 방사하여 지지체를 제조하는 방식의 경우, 섭씨 200도가 넘는 높은 방사 온도 조건에서 강한 자기장을 인가해야 하는 문제가 있으며, 불규칙한 방사 형태에 의하여 지지체를 적층 섬유의 형태로 제조하거나, 지지체에서 공극의 크기나 공극률을 미세하게 제어하는 것이 불가능하였다. 본 개시의 인장 방사 방식의 섬유 지지체 제조 방법에 의하면, 인장 방사 방식에 의해 섬유를 제조하고 레이어 형태로 섬유를 수집하여 각 레이어 별로 섬유의 교차 각도를 임의로 조절할 수 있고 이에 따라 적층 섬유를 원하는 형태로 조직하거나 공극의 크기 및 공극률을 제어하는 것이 가능하다. 또한, 고온이나 강한 자기장 조건에서 기기가 동작할 필요가 없으므로, 고온에 약한 푸드 그레이드의 천연 재료를 사용할 수 있고, 자기장 방식 대비하여 저비용, 저에너지로 스캐폴드를 제조할 수 있는 효과가 있다.

[0068] 일 실시예에 의하면, 섬유 수집기(132)는 수집면을 회전함으로써, 일방향으로 연장된 섬유들이 포함된 제1 섬유 레이어 상에, 일방향과 교차하는 타방향으로 연장된 섬유들을 포함하는 제2섬유 레이어를 획득하여, 적층 섬유 레이어를 제조할 수 있다. 예를 들어, 제1섬유 레이어의 섬유들과 제2섬유 레이어의 섬유들은 서로 직각을 이룰 수 있으나, 이에 한정하지 않고 소정의 각도(45도, 60도 등)를 이루도록 적층될 수 있다.

[0069] 다른 실시예에 의하면, 섬유 수집기(132)는 수집면을 회전하지 않고 고정하여 일방향으로 연장된 섬유들이 포함된 제1 섬유 레이어 상에, 일방향과 평행한 일방향으로 연장된 섬유들을 포함하는 제2섬유 레이어를 획득하여, 적층 섬유 레이어를 제조할 수 있다.

[0070] 또 다른 제3 실시예에 의하면, 섬유 수집기(132)는 제1 섬유 레이어의 섬유들의 연장 방향과 제2 섬유 레이어의 섬유들의 연장 방향은 서로 직각으로 교차하며, 제3 섬유 레이어의 섬유들의 연장 방향과 제4 섬유 레이어의 섬유들의 연장 방향은 평행하도록 수집면을 회전 또는 고정할 수 있다. 제3 실시예의 경우 레이어마다 직각과 평행이 다양하게 교차하는 구조로, 첫번째 실시예에 비해서는 공극률을 더 크게 할 수 있다.

[0071] 한편, 상술한 실시예들에서는 섬유 수집기(132)가 수집면을 회전하여 각 레이어마다 섬유들의 연장 방향이 다양하게 교차하도록 적층 섬유 레이어를 획득하는 내용을 개시하였으나, 본 발명은 이에 한정되지 않고 섬유 수집기(132)는 고정되고, 섬유 제조기(131)가 회전하여 각 레이어마다 섬유들의 연장 방향이 다양하게 교차하도록 적층 섬유 레이어를 획득할 수도 있다.

[0072] UV부(140)는 UV 램프를 포함할 수 있으며, 일 실시예에서 UV부(140)는 320nm 내지 390nm 파장 범위(유리하게는 365nm 파장)의 UVA(Ultraviolet A)를 사용할 수 있다. UV부(140)에서는 제조된 적층 섬유 레이어에 UV처리함으로써, 적층 섬유 레이어에 포함된 가교제가 광반응을 하여 자유 라디칼(free radical)을 형성하게 한다. 형성된

자유 라디칼은 젤라틴과 키토산의 작용기를 공격하고, 젤라틴과 키토산 각각의 작용기 결합 이온을 형성하게 한다. 형성된 각각의 작용기 결합 이온은 이 후 설명할 건조부(150)의 건조 및 탈수에 의해 서로 결합하여 가교반응을 통해 공유 결합을 형성하게 된다. 한편, UV부(140)는 100nm 내지 280nm 파장범위(유리하게는 256nm 파장)의 UVC(ultraviolet C)도 함께 또는 순차적으로 사용할 수 있다. 이 경우 UV부(140)는 제조된 적층 섬유 레이어를 멸균 처리할 수 있다.

[0073] 건조부(150)는 전원을 입력받아 열풍을 공급하기 위한 열풍 건조기를 포함할 수 있으며, 건조부(150)는 섬유 용액 제조부(110)에서 언급된 제1온도보다 낮은 제3온도의 열풍으로 스캐폴드를 건조시킨다. 제3온도는 섭씨 약 50도 내지 85도 일 수 있으며, 온도가 50도 미만인 경우 산성 용액의 휘발이 늦어지고 스캐폴드가 산성 조건에 오랫동안 노출되는 문제가 있으며, 온도가 85도 초과인 경우 콜라겐 성분이 열에 손상되어 이후 인공 피부 배양 시 세포 부착이 어려워 배양 효율이 떨어지는 문제가 있다.

[0074] 건조부(150)는 제3온도의 열풍으로 약 3일에서 5일 정도 스캐폴드를 건조한다. 3일 미만으로 건조하는 경우 산성 용액의 휘발이 부족하여 산성 조건에 스캐폴드가 계속적으로 노출되는 문제가 있으며, 5일 초과로 건조하는 경우 대량 생산에 적합하지 않은 문제가 있다.

[0075] 스캐폴드가 열풍 건조되는 동안 섬유에 포함되어 있던 산성 용액은 휘발되고, 탈수 축합 반응에 의해 아미노기를 포함하는 섬유 형성 단백질 물질 및 아미노 그룹을 포함하는 다당류 물질이 가교 결합을 하여 기계적 강성을 가지는 스캐폴드가 제작된다. 섬유는 피부를 구성하는 단백질 물질을 포함함으로써, 인공 피부 제조를 위한 섬유아세포 부착을 용이하게 하고, 가소제를 포함함으로써 뭉치지 않고 일정한 두께를 가지는 섬유들이 적층된 스캐폴드 형성이 가능하며, 가교제를 포함함으로써 가교 반응이 보다 빠르고 효율적으로 일어나도록 한다.

[0076] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 의한 스캐폴드를 전자현미경으로 관찰한 사진들이다.

[0077] 위에서 설명한 방법을 통해 제조된 스캐폴드는 다수의 섬유들의 적층으로 형성되며, 섬유는 식품 원료 성분으로만 이루어지는 것을 특징으로 한다. 상세히, 섬유는 젤라틴, 알부민, 프롤라민, 감마폴리글루탐산 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹에서 선택된 하나 이상의 식품 원료 성분이며 아미노기를 포함하는 섬유 형성 단백질 물질 및 키토산과 같이 식품 원료 성분이며 아미노 그룹을 포함하는 다당류 물질이 탈수 축합 반응에 의해 가교 결합된 구조를 가진다. 또한, 섬유는 콜라겐과 같이 인공 피부와 접착력을 개선하며 피부를 구성하는 단백질 물질로 식품 원료 성분을 포함한다. 또한 섬유는 아스코르브산, 게니핀, 효소, 아미노산, 폴리페놀, 페놀산, 유기산, 리보플라빈 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹에서 선택한 하나 이상의 식품 원료 성분인 가교제를 포함한다. 또한, 섬유는 글리세롤, 소르비톨, 프로필렌글리콜 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹에서 선택된 하나 이상의 식품 원료 성분으로 섬유의 뭉침을 방지하는 가소제를 더 포함할 수 있다.

[0078] <스캐폴드의 구성>

[0079] 본 발명의 일 실시예에 의한 스캐폴드는 식품 원료 성분으로만 이루어지는 것을 특징으로 한다. 일 실시예에서 스캐폴드는 약 45 내지 65 중량부의 젤라틴, 약 20 내지 30 중량부의 가소제, 약 0.01 내지 0.1 중량부의 가교제, 약 1 내지 5 중량부의 콜라겐, 약 10 내지 20 중량부의 키토산을 포함할 수 있다.

[0080] 여기서 젤라틴이 45 중량부 미만인 경우 강성도가 낮아 스캐폴드가 지지력을 제공하지 못하는 문제가 있으며, 젤라틴이 65 중량부 초과인 경우 세포와 스캐폴드 간의 상호 작용이 저하되는 문제가 있다.

[0081] 여기서 가소제가 20 중량부 미만인 경우 스캐폴드 내 섬유가 뭉치는 문제가 발생하며, 가소제가 30 중량부 초과인 경우 스캐폴드가 지지력을 제공하지 못하는 문제가 있다.

[0082] 여기서 가교제가 0.01 중량부 미만인 경우 젤라틴과 키토산을 가교 결합이 충분하지 않게 되어 스캐폴드의 강성도가 낮아 지지력이 약해지며, 가교제가 0.1 중량부 초과인 경우 스캐폴드 내 섬유가 뭉치는 문제가 발생한다.

[0083] 여기서 콜라겐이 1 중량부 미만인 경우 피부의 섬유조직을 만드는 섬유아세포(fibroblast)가 섬유 용액으로 제조된 스캐폴드에 부착하기 어려우며, 콜라겐이 5 초과인 경우 스캐폴드가 충분한 지지력을 제공하지 못하는 문제가 있다.

[0084] 여기서 키토산이 10 중량부 미만인 경우 가교 결합이 충분히 이루어지지 않아 스캐폴드의 용해도 및 강성도에 문제가 발생하며, 키토산이 20 중량부 초과인 경우에는 활성 세포(human foreskin fibroblasts)의 강성도 및 영률 특성에 적합하지 않아 이후 제대로 된 인공 피부를 제조할 수 없다.

[0085] 하지만, 이에 한정하지 않고, 스캐폴드를 구성하는 성분의 양은 섬유 용액의 구성에 따라 달라질 수 있다.

[0086] 또한 스캐폴드는 일방향으로 연장된 섬유들이 (일방향과 교차하는) 타방향으로 나열되어 형성된 섬유 레이어가 복수개 적층된 구조를 가지며, 여기서 일 레이어의 섬유들의 연장 방향과 다른 레이어의 섬유들의 연장 방향은 서로 교차 또는 평행하게 배치되어 전체 스캐폴드 상에서 복수의 공극이 형성된 것을 특징으로 한다.

[0087] 도 3(a)에는 각 레이어 별로 섬유의 연장 방향이 교차하도록 적층된 직교 방사 형태의 스캐폴드의 사진이다. 이 경우, 예를 들어, 제1섬유 레이어의 섬유들과 제2섬유 레이어의 섬유들은 서로 교차하고, 제2레이어의 섬유들과 제3레이어의 섬유는 서로 교차하도록 적층될 수 있다.

[0088] 도 3(b)는 일부 레이어는 섬유의 연장 방향이 교차하나 일부 레이어는 섬유 연장 방향이 평행하게 적층된 혼합 방사 형태의 스캐폴드의 사진이다. 이 경우, 예를 들어, 제1섬유 레이어의 섬유들과 제2섬유 레이어의 섬유들은 서로 교차하고, 제3섬유 레이어의 섬유들과 제4섬유 레이어의 섬유는 서로 평행하도록 적층될 수 있다.

[0089] 도 3(c)는 각 레이어 별로 섬유의 연장 방향이 평행하게 적층된 평행 방사 형태의 스캐폴드의 사진이다. 이 경우, 예를 들어, 제1섬유 레이어의 섬유들과 제2섬유 레이어의 섬유들은 서로 평행하고, 제2섬유 레이어의 섬유들과 제3섬유 레이어의 섬유 또한 서로 평행하도록 적층될 수 있다.

[0090] <스캐폴드 섬유의 직경>

[0091] 스캐폴드를 이루는 섬유의 직경은 약 0.8마이크로미터(㎛) 내지 2.4 마이크로미터(㎛)일 수 있으며, 평균 직경 1.6 마이크로미터에 오차범위 ±0.8마이크로미터일 수 있다. 직경이 0.8 마이크로미터 미만인 경우 원하는 강도나 인장력을 얻기 어려우며, 직경이 2.4 마이크로미터 초과인 경우 세포와 관계하는 표면적이 작아져서 세포의 부착이 어려우며 증식이 어려운 문제가 있다.

[0092] <건조상태 스캐폴드 공극의 평균 크기 및 두께>

[0093] 도 3(b)처럼 혼합 방사 형태의 스캐폴드를 제조하였을 때, 스캐폴드의 건조 상태에서 공극의 크기는 약 0.1 제곱마이크로미터($㎛^2$) 내지 2.7제곱마이크로미터($㎛^2$)일 수 있으며, 평균 크기 1.4 제곱마이크로미터($㎛^2$)에 오차범위 ±1.3 제곱마이크로미터($㎛^2$)일 수 있다. 스캐폴드의 건조 상태에서 두께는 약 0.5밀리미터(㎜) 내지 0.6밀리미터(㎜)일 수 있다. 건조 상태에서 공극의 크기가 0.1 제곱마이크로미터($㎛^2$) 미만이면, 추후 수화 상태에서 공극이 너무 작아 인공 피부를 배양하였을 때 영양분이나 배출물의 운송에 문제가 생기며, 공극의 크기가 2.7제곱마이크로미터($㎛^2$) 초과인 경우 균일한 세포 배양이 어려운 문제가 발생한다. 건조 상태에서 스캐폴드 두께가 0.5밀리미터 미만인 경우에는 세포 배양을 위한 충분한 두께의 지지체가 형성되지 않으며, 두께가 0.6밀리미터 초과인 경우에는 배양액이 침투 후 적층된 섬유 레이어와 층 사이의 분리 현상이 관찰될 수 있다.

[0094] <수화상태 스캐폴드 공극의 평균 크기 및 두께>

[0095] 한편, 도 3(b)처럼 혼합 방사 형태의 스캐폴드를 제조하였을 때, 스캐폴드는 수화 상태에서 공극의 크기는 약 2.1 제곱마이크로미터 내지 2.3 제곱마이크로미터일 수 있으며, 스캐폴드의 수화 상태에서 두께는 약 0.8 밀리미터 내지 1.0 밀리미터일 수 있다. 수화 상태란, 스캐폴드를 물이나 용매에 침지 한 이후의 상태를 의미한다. 수화 상태에서 공극의 평균 크기가 2.1 제곱마이크로미터 미만이면, 공극이 너무 작아 인공 피부를 배양하였을 때 영양분이나 배출물의 운송에 문제가 생기며, 공극의 평균 크기가 2.3 제곱마이크로미터 초과인 경우 균일한 세포 배양이 어려운 문제가 발생한다. 수화 상태에서 스캐폴드 평균 두께가 0.8 밀리미터 미만인 경우에는 세포 배양을 위한 충분한 두께의 지지체가 형성되지 않으며, 1.0 밀리미터 초과인 경우에는 배양액이 침투 후 적층된 섬유 레이어와 층 사이의 분리 현상이 관찰될 수 있다.

[0096] <스캐폴드의 공극률>

[0097] 수화상태에서 스캐폴드의 공극률은 약 30 내지 70% 일 수 있다. 공극률이 30% 미만인 경우 확산도가 낮아져 독성 물질의 실험을 위한 인공 피부의 제조에 적합하지 않고, 공극률이 70% 초과인 경우 세포 배양 효율이 떨어지는 문제가 있다.

[0098] <스캐폴드의 용해도(solubility)>

[0099] 스캐폴드의 용해도는 약 28% 내지 60% 일 수 있다. 용해도가 28% 미만인 경우, 공극이 너무 작아져 비교적 큰 세포들은 섬유 내부까지 들어가지 못하고 표면에만 모이는 단점이 있으며, 용해도가 60% 초과인 경우에는 공극이 너무 커져 세포가 섬유 세포에 부착하지 못하고 섬유들 사이로 많은 양의 세포가 빠져나가 세포가 충분한 지

지체 없이 떠다니며 인공 피부의 구조적인 안정성이 저하되는 문제가 있다. 이처럼 스캐폴드의 용해도는 공극과 연관이 있으며, 제조된 섬유가 수화상태에서 일부 용해되어 공극률의 변화가 발생하며, 용해도는 수화상태의 스캐폴드의 공극률을 제어할 수 있는 요소가 될 수 있다.

[0100] <스캐폴드의 강성도(Young‘s modulus)>

[0101] 스캐폴드의 강성도는 약 5kPa 내지 30kPa 일 수 있다. 강성도가 5kPa 미만인 경우 스캐폴드가 지지력을 제공하지 못해 세포 구조의 불안정성이 발생하며, 강성도가 30kPa 초과인 경우 세포와 스캐폴드 간의 상호 작용이 저하되어 조직 형성이 어렵고 세포의 확장 및 분화 효율이 급격히 떨어지는 문제가 있습니다.

[0102] 이하 구체적인 실시예들을 통해 본 발명에 의한 스캐폴드 제조 방법 및 이를 이용한 인공 피부 제조 방법을 구체적으로 설명한다. 다만, 하기의 실시예들은 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐이므로 이것에 의해 본 발명의 권리범위가 제한되어서는 안 된다.

[0103] [실시예 1]

[0104] 도 1에 도시된 장치를 이용하여 스캐폴드를 제조하였다. 구체적으로, 글리세롤 0.8g, 젤라틴 2.0g, 초산 6.0ml, 콜라겐 0.1ml, 리보플라빈 4.5ml 및 키토산 0.50g으로 섬유 용액을 제조하였다. 구체적으로 섭씨 95도에서 글리세롤, 젤라틴 및 리보플라빈을 용해하고, 초산을 첨가하고, 섭씨 45도에서 키토산 및 콜라겐을 혼합하여 교반 용해한다. 도 1의 제조 장치를 사용하여 제조된 섬유 용액으로 2.5 cm x 2.5 cm의 적층 섬유 레이어를 제조한 다음, UV에서 2시간 처리한다. 다음으로 UV 처리된 적층 섬유 레이어를 섭씨 약 60도에서 3일동안 열풍 건조한다.

[0105] [용해도(solubility) 측정]

[0106] 제조된 스캐폴드의 질량을 잰 후에, 이를 인산염 완충 식염수(phosphate-buffered saline, PBS) 용액 50 mL가 들어 있는 비커에 넣고 25° C에서 18시간 동안 교반하였다. 교반 후 용해되지 않은 스캐폴드를 분리하여 105° C에서 1시간 동안 건조 시킨 후에 질량을 측정하였다. 스캐폴드의 용해도는 Solubility (%) = {(W1-W0)/W0}*100을 사용하여 계산하였다. (여기서, W0는 스캐폴드의 초기 질량(g)이고, W1는 용해되지 않은 스캐폴드의 건조 후 질량(g)이다.)

[0107] 실시예 1의 경우 낮은 용해도인 오차 범위 ±0.50의 29.74%가 측정되었다.

[0108] [스캐폴드의 강성도(Young’s modulus) 측정]

[0109] 제조된 스캐폴드를 인산염 완충 식염수(PBS) 용액에 담그고 팽윤(swelling)된 스캐폴드를 여과지로 닦아 과잉 용액은 제거하고 다축 미세재료 물성 분석기(Multi-axis Micro-Texture Analyzer)를 이용하여 초기 그립 길이가 3.5 cm인 2 mm/s의 크로스 헤드 속도에서, 스캐폴드의 인장 강도(tensile strength, TS) 및 파단 연신율(elongation at break, EAB)을 측정하였다. 측정은 3회 반복적으로 수행되었으며, 결과를 이용하여 강성도(Young’s modulus)가 계산되었다.

[0110] 실시예 1의 경우 높은 강성도인 오차 범위 ±1.22의 14.10 kPa이 측정되었다.

[0111] [스캐폴드의 항균 활성 측정]

[0112] 제조된 스캐폴드를 항균성 섬유 직물 평가 법인 KS K 0693 준용 평가한 결과, 황색포도상구균(Staphylococcus aureus)에 특이적으로 항균력이 98.64%로 매우 우수한 것으로 평가되었다.

[0113] [실시예2]

[0114] 본 발명의 일 실시예에 의한 스캐폴드를 다공성 트랜스웰에 넣고, 플레이트에 삽입하였다. 배양액은 10% 소태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS)가 첨가된 둘베코 변형 필수 배지(Dulbecco's Modified Essential Medium, DMEM)로 준비한다. $3.6X10^{5}$mg/ml의 농도로 섬유아세포를 배양액에 분산시킨 뒤 0.1ml씩 고르게 스캐폴드에 첨가하였다. 배양액을 첨가한 스캐폴드는 섭씨 37도에서 30분간 배양한 이후, 1.1ml의 배양액을 다시 첨가하여 섭씨 37도, 5%의 이산화탄소 조건에서 배양한다. 배양 과정에서 2일마다 배양액을 교체한다

[0115] [섬유아세포 생존도]

[0116] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 의한 스캐폴드에 의한 섬유아세포 생존도를 나타낸 실험 결과이다.

[0117] 실시예 2에서 섬유아세포가 배양된 스캐폴드, 즉 인공 피부를 둘베코 인산 완충 생리 식염수 (Dulbecco's phosphate-buffered saline, DPBS)로 세번 세척하고, 4μM으로 준비된 생존 세포를 염색하는 녹색 염색제(calcein-AM)과 죽은 세포를 염색하는 적색 염색제(ethidium homodimer-1)에 담지한다. 그리고, 섭씨 37도, 5%의 이산화탄소 조건에서 40분간 보관한 뒤, 둘베코 인산 완충 생리 식염수로 세번 세척하고, 도립 형광 현미경(Inverted fluorescent microscope)을 이용하여 세포 생존도를 정량화하였다.

[0118] 본 발명의 일 실시예에 의한 스캐폴드에 피부를 구성하는 주요 세포인 섬유아세포 세포 배양액을 추가하여 세포를 배양한 결과 7일까지 배양했을 때 89% 이상의 높은 섬유아세포 생존도(viability)를 확인할 수 있다.

[0119] 이하에서는 본 발명의 실시예에 의한 스캐폴드에 대한 대조군으로 이미 공지된 콜라겐 수화겔을 비교예로 사용한 경우에 대한 실험 결과를 제시한다.

[0120] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 의한 스캐폴드의 확산도와 비교예의 확산도를 비교한 그래프이다.

[0121] 실시예 및 비교예를 주사 전자 현미경을 통해 관찰하고, 공극은 주사 전자 현미경의 이미지를 바탕으로 계산하였다. 실시예에 의한 스캐폴드의 건조 상태 두께는 약 0.5mm 내지 0.6 mm이며, 공극은 평균 약 1.4 $\mu m^2$의 크기를 가지며, 수화 상태에서 팽창되어 공극은 평균 약 2.2 $\mu m^2$로 증가하였다. 실시예의 공극의 크기는 비교예에 비하여 약 3.2배 큰 것으로 측정되었다.

[0122] 확산도 측정을 위하여, 확산 모델로는 250kDa의 분자량을 가지는 형광 확산 모델 FITC-Dextran(Fluorescein Isothiocyanate-Dextran)을 최종 농도가 4mg/ml가 되도록 하여 실시예 및 비교예에 침지하고, 시간 간격을 두고 확산되어 빠져나오는 형광 물질의 양을 측정하였다. 이 때 형광 물질의 양은 일정한 높이(예를 들어 38마이크로미터)를 갖는 미세 유체 채널을 통해 정량화 하였다. 확산되어 나온 형광 물질의 양을 공지된 과도 확산 이론을 근거로 하여 확산도를 계산하였다. 실시예의 확산도는 약 $1.1\times10^{-11}$ $m^2/s$ 로 측정되었으며, 이는 비교예에 비하여 약 1.8배 큰 것이다.

[0123] 도 6은 본 발명의 일 실시예에 의한 스캐폴드의 수축 특성을 나타내기 위한 두께 변화 사진 및 그래프이다.

[0124] 실시예에 의한 스캐폴드에 피부를 구성하는 주요 세포인 섬유아세포를 일주일 배양하여 수축 특성을 관찰하였다. (a)의 경우 세포 배양 전의 스캐폴드 단면 사진과 일주일 후 세포가 배양된 스캐폴드의 단면 사진이다. (b)에 나타난 바와 같이 스캐폴드는 수축없이 약 0.8mm 내지 1.0mm의 인공 피부를 제조할 수 있음을 확인할 수 있다. 비교예의 콜라겐 수화겔의 경우 피부 세포 배양시 수축이 발생하는 단점이 있으나, 실시예의 경우 수축이 발생하지 않는 것을 확인하였다.

[0125] 도 7은 본 발명의 일 실시예에 의한 스캐폴드에서 피부 상피 세포가 분화됨을 검증하기 위한 사진이다. 도 8은 도 7의 사진을 공초점 현미경으로 재구성한 이미지들이다. 공초점 현미경은 시료에서 슬라이스 이미지를 생성하며, 공초점 레이저 스캐닝 현미경(Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM)이라고도 지칭한다.

[0126] 실시예에 의한 스캐폴드에 피부 상피 세포를 배양한 후, 배양한 피부 상피 세포를 공기에 10일 동안 노출시키고, 두 종류의 분화 타겟 발현 마커인 케라틴 5번(keratin-5)와 인볼루크린(involucrin)을 이용하여 각각 이른 단계의 분화가 발현되었는지 및 늦은 단계의 분화가 발현되었는지 확인하였다. 분화 타겟 발현 마커는 피부 상피 세포의 표피층에 포함된 유전자에 발현되기 때문에, 공초점 현미경으로 재구성한 이미지에서 스캐폴드의 상단 표면 부분에 분화 타겟 발현 마커이 표시되어야 한다. 도 8에서는 파란색으로 표시된 스캐폴드의 상단 표면에 빨간색으로 표시된 피부 상피 세포 분화 발현 마커가 표시된 것을 확인할 수 있다.

[0127] 이와 같이 본 발명은 도면에 도시된 일 실시예를 참고로 하여 설명하였으나 이는 예시적인 것에 불과하며 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 실시예의 변형이 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서, 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

## *부호의 설명*

[0128] 100: 스캐폴드 제조 장치

110: 섬유 용액 제조부

120: 섬유 용액 공급부

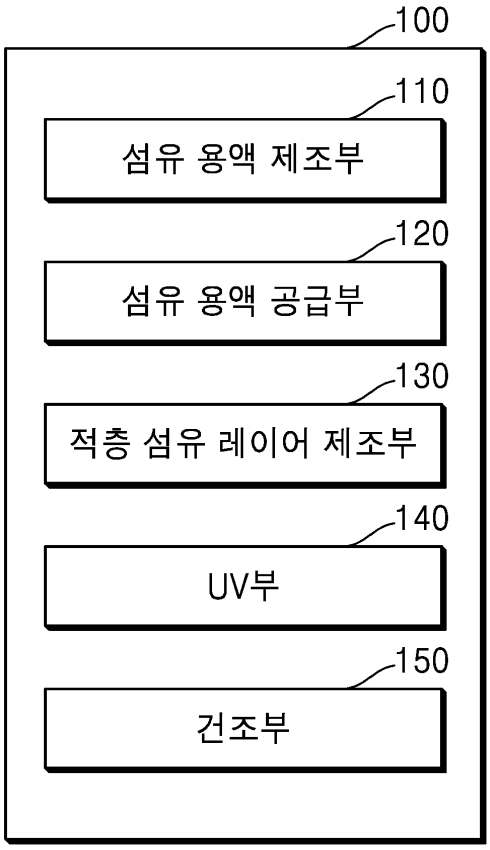
130: 적층 섬유 레이어 제조부

140: UV 부

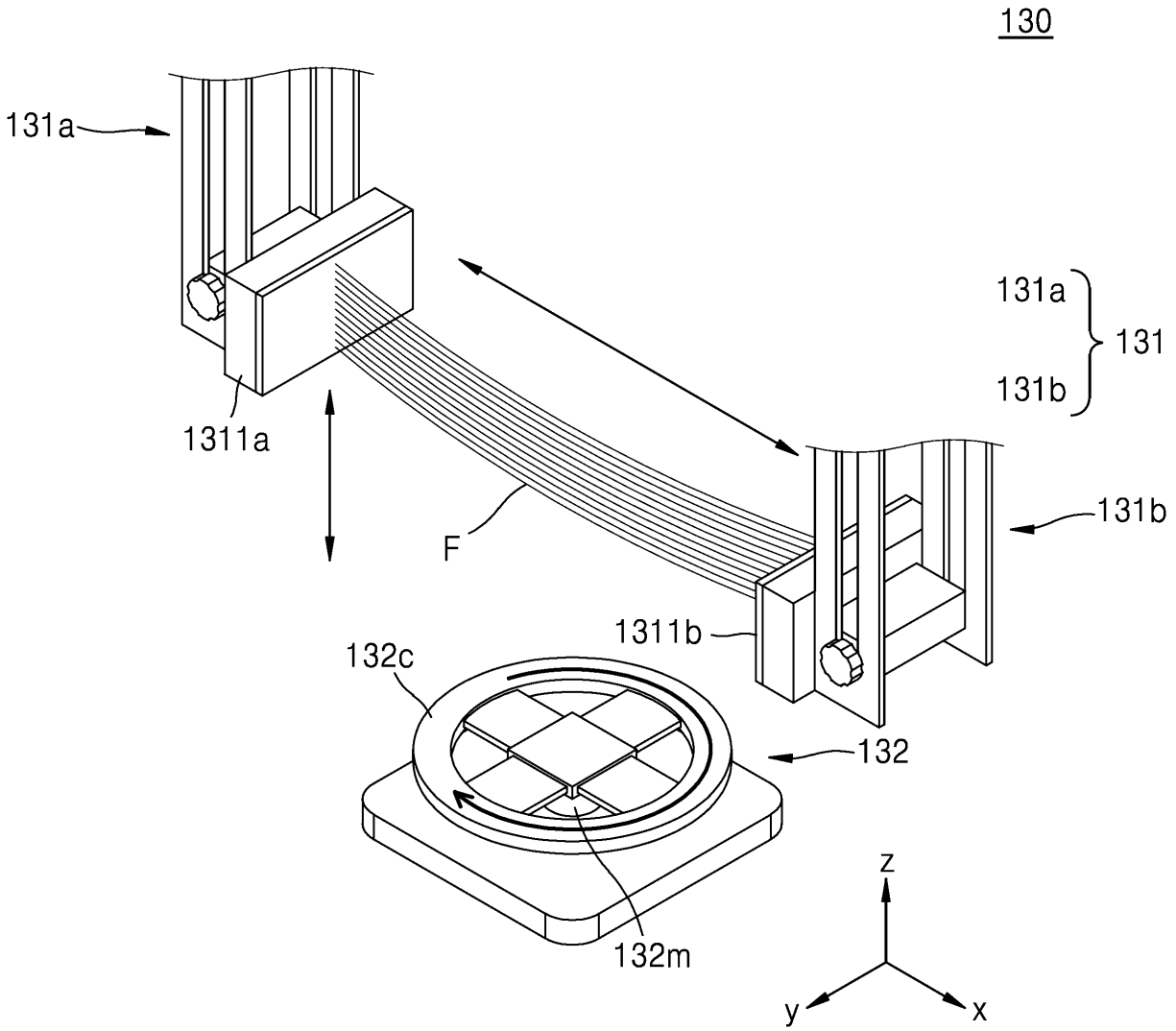
150: 건조부

## 도면

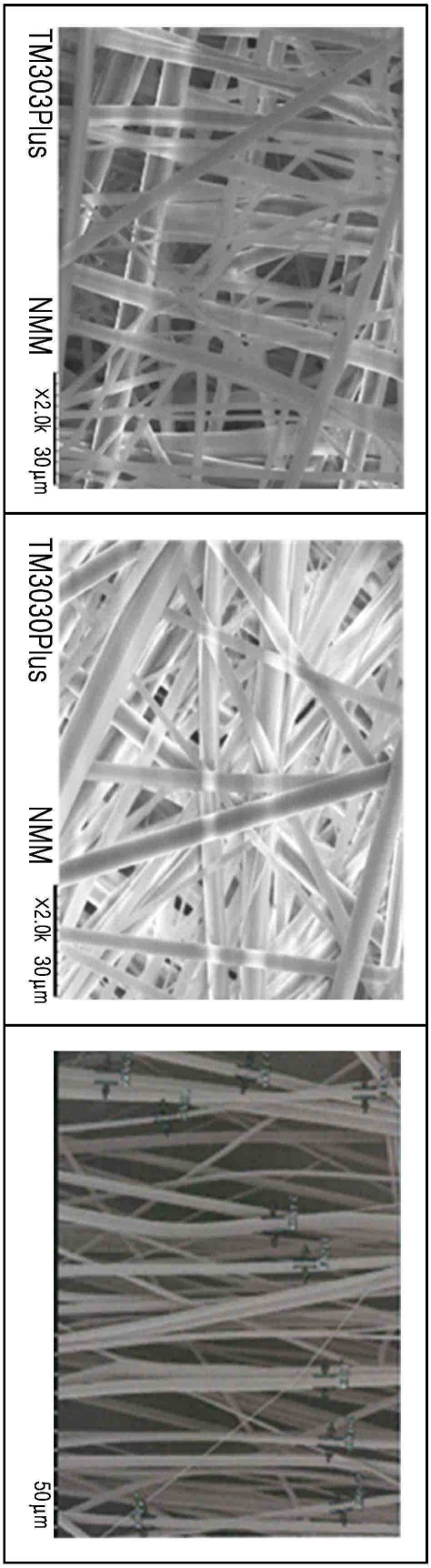
### 도면1



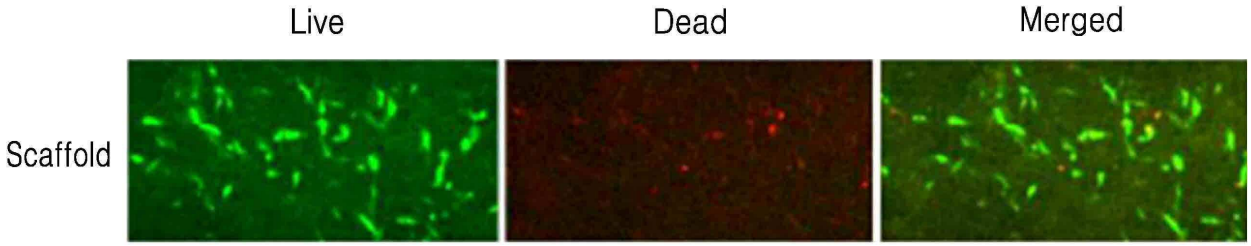
도면2



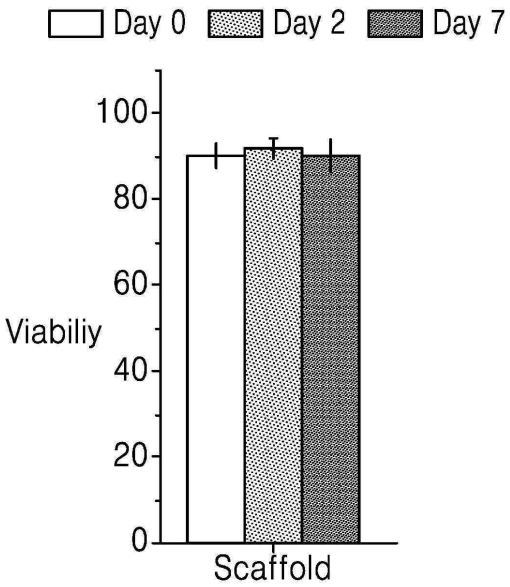
도면3



도면4

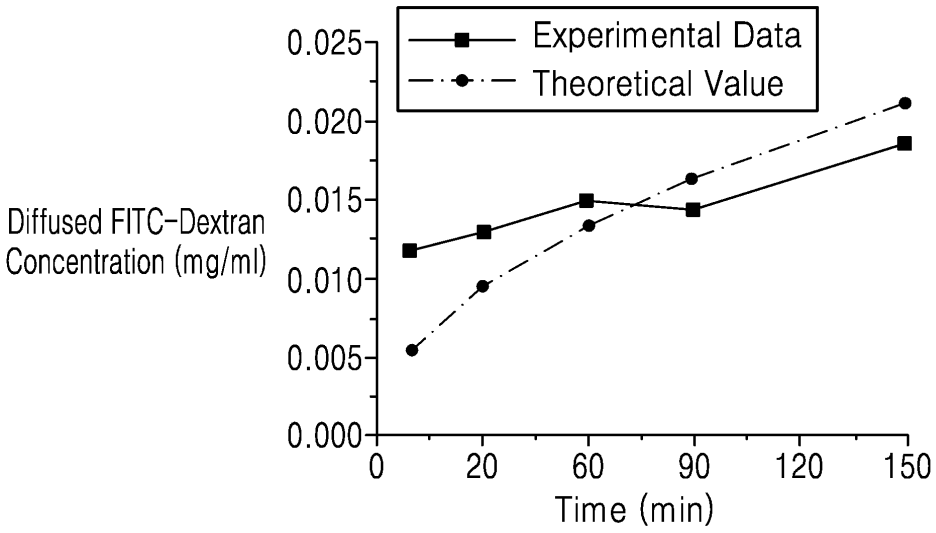

Live
Dead
Merged
Scaffold

(a)

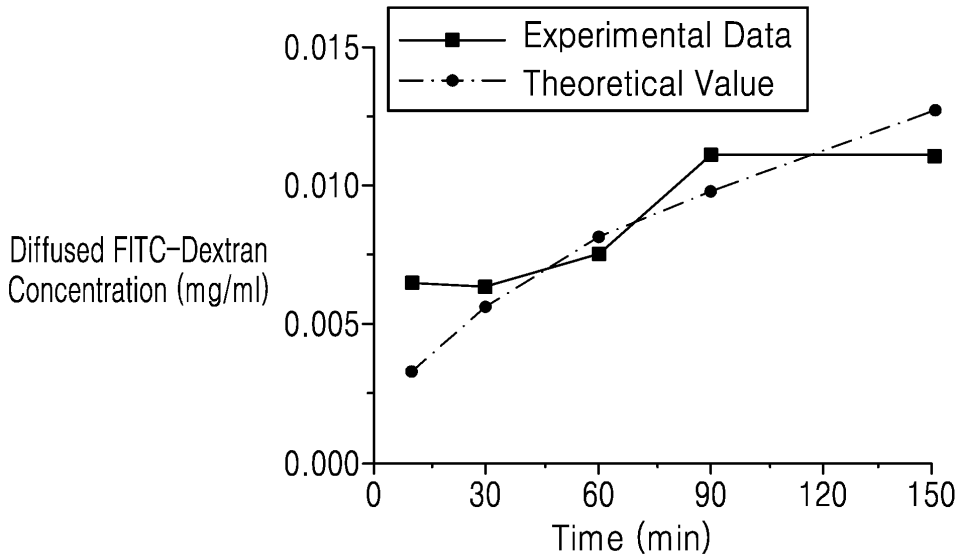

Day 0
Day 2
Day 7
100
80
60
40
20
0
Viabiliy
Scaffold

(b)

도면5

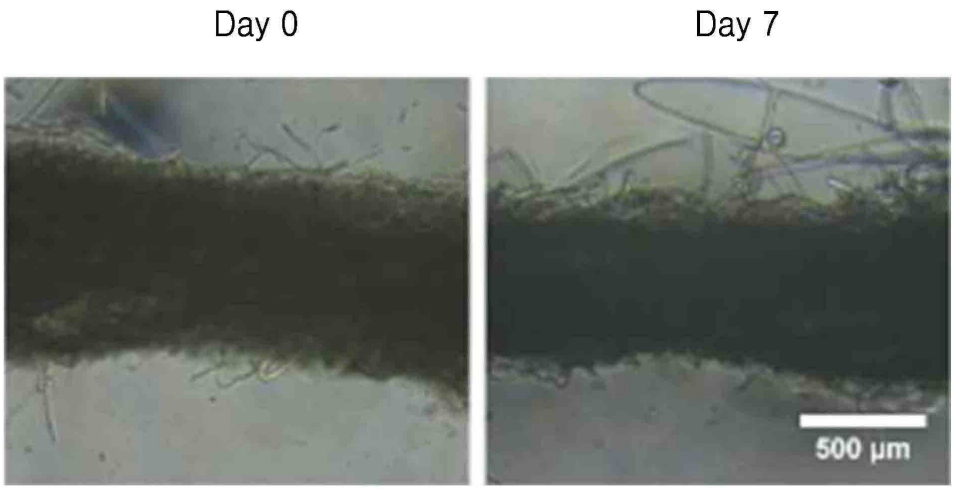

Experimental Data
Theoretical Value
Diffused FITC-Dextran Concentration (mg/ml)
0.025
0.020
0.015
0.010
0.005
0.000
0
20
60
90
120
150
Time (min)

(a)

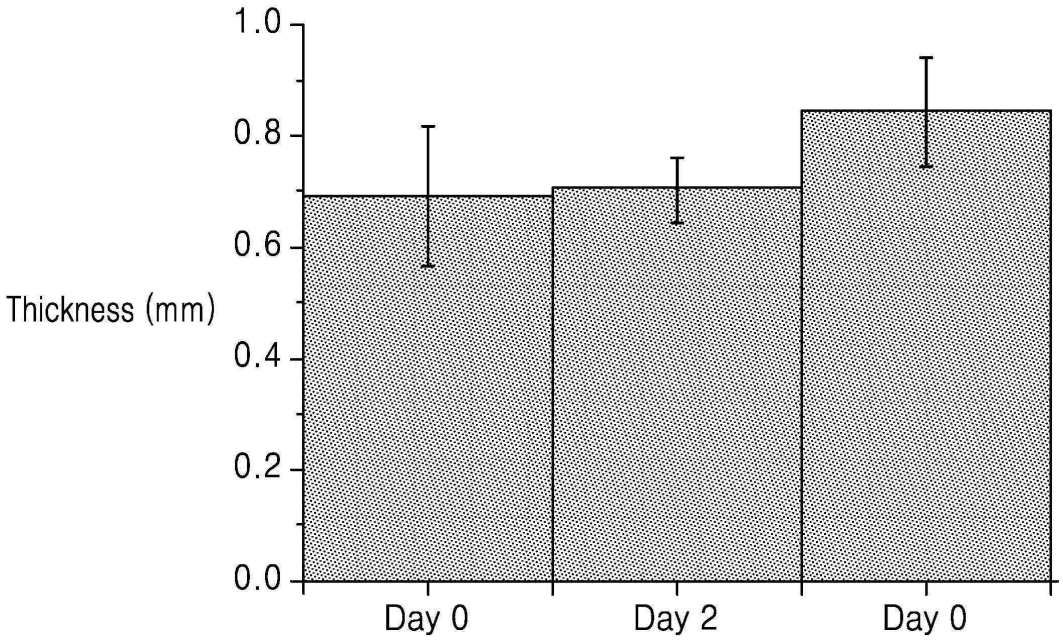

Experimental Data
Theoretical Value
Diffused FITC-Dextran Concentration (mg/ml)
0.015
0.010
0.005
0.000
0
30
60
90
120
150
Time (min)

(b)

도면6

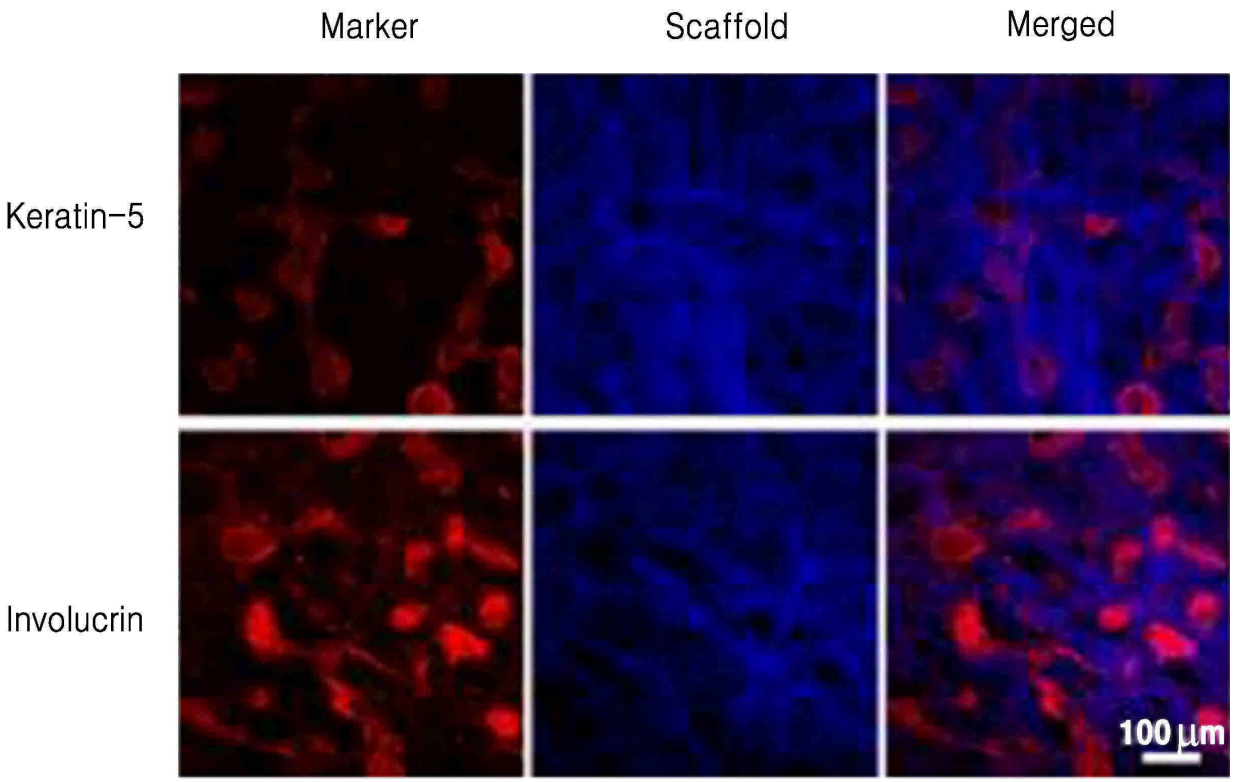



(a)

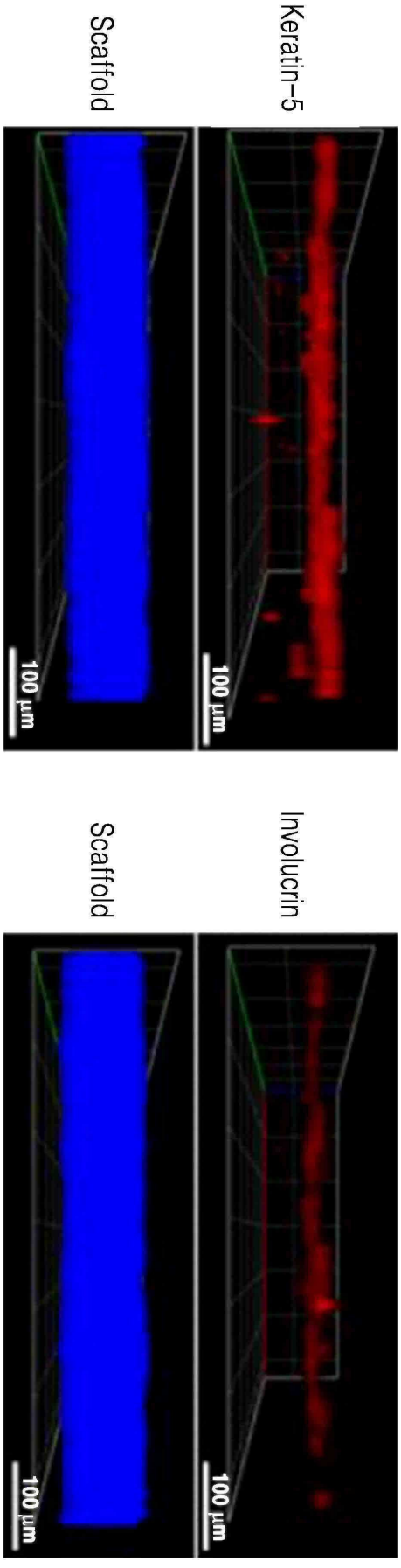



(b)

도면7



도면8


Keratin-5
Scaffold
Involucrin
Scaffold
100 μm
100 μm
100 μm
100 μm