

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2022 년 1 월 27 일 (27.01.2022)



(10) 국제공개번호
WO 2022/019688 A1

(51) 국제특허분류:

C12N 5/071 (2010.01) *C12M 1/12* (2006.01)
C12N 13/00 (2006.01) *C12M 1/42* (2006.01)
C12M 3/00 (2006.01) *A23L 13/00* (2016.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2021/009506

(22) 국제출원일: 2021 년 7 월 22 일 (22.07.2021)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2020-0090736 2020 년 7 월 22 일 (22.07.2020) KR

(71) 출원인: 연세대학교 산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) [KR/KR]; 03722 서울시 서대문구 연세로 50, Seoul (KR).

(72) 발명자: 홍진기 (HONG, Jinkee); 03722 서울시 서대문구 연세로 50, Seoul (KR). 박소현 (PARK, Sohyeon); 03722 서울시 서대문구 연세로 50, Seoul (KR).

(74) 대리인: 특허법인 플러스 (PLUS INTERNATIONAL IP LAW FIRM); 35209 대전시 서구 한밭대로 809, 10층, Daejeon (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,

SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

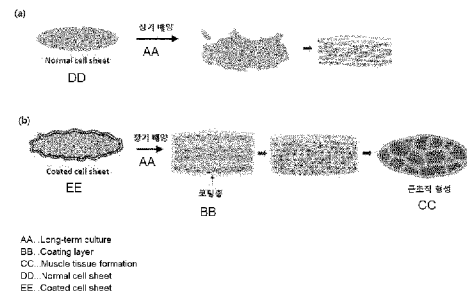
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING CULTURED MEAT ON BASIS OF CELL SHEET COATING TECHNIQUE, AND CULTURED MEAT PRODUCED THEREBY

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



(57) Abstract: The present invention relates to a method for producing cultured meat, comprising the steps of culturing cells, which can be used in the production of cultured meat, so as to form a cell sheet and coating the cell sheet so that the cells are cultured in a form of having a nanofilm formed on the surfaces thereof. The present invention provides: a method for producing cultured meat, the method protecting cell layers from external stress and stably proliferating cells so as to express excellent mechanical strength; and cultured meat which is reproduced as tissues that are similar to muscle tissues of actual animals, so as to have a quality and taste that are improved over those of conventional cultured meat.

(57) 요약서: 본 발명은 배양육 제조에 사용 가능한 세포를 배양하여 세포시트를 형성하고, 세포시트를 코팅하여 표면에 나노필름을 형성한 형태로 세포를 배양하는 단계를 포함하는 배양육 제조방법에 관한 것으로서, 외부 스트레스로부터 세포층을 보호하고, 안정적인 세포 증식을 수행함으로써 기계적 강도가 우수하게 발현되는 배양육 제조방법을 제공하며, 실제 동물의 근육 조직과 유사한 조직을 재현함에 따라 기존 배양육에 비하여 향상된 육질 및 맛을 구현한 배양육을 제공한다.



WO 2022/019688 A1

명세서

발명의 명칭: 세포시트의 코팅기술을 기반으로 한 배양육 제조방법 및 이로부터 제조된 배양육

기술분야

- [1] 본 발명은 세포시트의 코팅기술을 기반으로 한 배양육 제조방법 및 이로부터 제조된 배양육에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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 성장시킨 후 근섬유 착색과 지방 혼합 등을 거쳐 배양육을 제조하게 된다. 이 때 제조과정에는 스캐폴드(scaffolds)를 사용하기도 하고, 자기조직화법(self-organizing methods)을 사용하기도 한다.
- [7] 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.
- [8] 뿐만 아니라, 현재 생산되고 있는 배양육의 외양 및 식감은 기존의 고기와는 상당히 다른 모습을 보이고 있다. 다진 고기 형태인 패티로 개발이 시작되었고, 최근에는 가공육과 유사한 맛과 질감을 내는 정도에 이르렀으나, 여전히 소비자의 소비 의도를 자극하기에는 한계가 있다.
- [9] 배양육의 상용화를 위해서는 대량 생산 기술의 확보 및 실제 육류와 흡사한 맛과 질감을 구현할 수 있도록 실제 근육조직과 유사한 형태로의 배양기술이 필요한 실정이다.
- [10] 선행기술
- [11] 특허문헌
- [12] 미국등록특허 제7270829호 (2007.09.18.)

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [13] 본 발명은 상기 기술적 과제를 해결하기 위하여 안출된 것으로서, 배양육 세포로부터 자기조직화 기술에 의한 조직화된 근조직을 형성함으로써, 구조화된 배양육의 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [14] 본 발명은 세포시트의 표면을 코팅하여 보호함으로써, 세포시트의 기계적 물성을 향상시키고, 이를 통해 실제 근조직과 유사한 형태로 분화되는 배양육의 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [15] 또한 본 발명은 세포시트의 다층 적층시, 부착력이 감소되는 문제를 해결하여, 고분자 지지체를 이용하지 않고 3차원적인 근조직 형성이 용이한 배양육의 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [16] 본 발명은 세포시트의 다층 적층에도 세포 간 접합을 강하게 유지하여, 세포

물성을 조절할 수 있고, 배양육 제조에 최적화된 세포의 대량 증식 및 분화 환경을 조성하는 것을 목적으로 한다.

기술적 해결방법

- [17] 상술한 바와 같은 과제를 해결하기 위하여 본 발명에 따른 배양육 제조방법은 배양육 제조에 사용 가능한 세포를 배양하여 단일 세포시트를 형성하는 단계; 상기 단일 세포시트를 수득하는 단계; 상기 수득한 단일 세포시트를 코팅하여 세포시트 표면에 나노필름을 형성하는 단계; 상기 코팅된 단일 세포시트를 적층하여 다층의 세포시트를 형성하는 단계; 및 상기 적층된 세포시트들로부터 근육 조직이 형성되는 단계;를 포함한다.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 본 발명의 일 양태에 따른 배양육 제조방법에 있어서, 나노필름은 양전하성 물질 및 음전하성 물질이 교대로 적층되어 형성되는 것일 수 있다.
- [21] 본 발명의 일 양태에 따른 배양육 제조방법에 있어서, 양전하성 물질은 키토산, 녹말, 콜라겐, 젤라틴, 피브리노겐, 실크피브로인, 카제인, 엘라스틴, 라미닌, 및 피브로넥틴으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상일 수 있다.
- [22] 본 발명의 일 양태에 따른 배양육 제조방법에 있어서, 음전하성 물질은 히알루론산, 알지네이트, 타닌산, 리그닌, 셀룰로오스, 헤파린, 카라기난, 한천, 산탄검, 아라비아검, 글루코만난, 카르복실메틸셀룰로오스(CMC) 및 타라검으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상일 수 있다.
- [23] 본 발명의 일 양태에 따른 배양육 제조방법에 있어서, 나노필름의 두께는 50 내지 5000 nm일 수 있다.
- [24] 본 발명의 일 양태에 따른 배양육 제조방법에 있어서, 상기 나노필름을 형성하는 단계 이후, 보호층을 형성하는 단계를 포함할 수 있다.
- [25] 본 발명의 일 양태에 따른 배양육 제조방법에 있어서, 상기 코팅된 세포의 배양시 초음파, 전류, 전자기장, 자기장 또는 이들의 조합된 자극을 처리할 수 있다.
- [26] 본 발명의 일 양태에 따른 배양육 제조방법에 있어서, 상기 나노필름을 형성하는 단계 이후, 세포 성장인자를 첨가하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [27] 본 발명의 일 양태에 따른 배양육 제조방법에 있어서, 상기 근육 조직에 지방 및 착색제를 첨가하는 단계;를 더 포함할 수 있다.

- [28] 또한 본 발명은 상술한 바와 같은 배양육 제조방법에 의하여 제조된 배양육을 제공한다.
- [29] 또한 본 발명은 기관; 양전하성 물질 및 음전하성 물질이 교대로 적층된 다공성 코팅층; 및 보호층을 포함하는, 배양육 제조용 세포배양 플랫폼을 제공한다.
- [30] 본 발명의 일 양태에 있어서, 상기 다공성 코팅층은 양전하성 물질 및 음전하성 물질이 가교결합된 것일 수 있다.
- [31] 본 발명의 일 양태에 있어서, 상기 다공성 코팅층은 C-피코시아닌을 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [32] 본 발명에 따른 배양육 제조방법은 세포시트 표면 코팅을 통해 외부 스트레스로부터 세포층을 보호하고, 안정적인 세포 증식을 수행하여 배양육 제조에 최적화된 환경을 제공한다.
- [33] 본 발명에 따른 배양육 제조방법은 배양육 세포로부터 자기조직화 기술에 의한 조직화된 근조직을 형성함으로써, 구조화된 배양육을 제공할 수 있는 장점이 있다.
- [34] 본 발명에 따른 배양육 제조방법은 세포시트의 기계적 물성을 향상시킴에 따라, 세포시트의 다층 적층에도 실제 근조직과 유사한 형태로 분화되는 양상을 나타낼 수 있다.
- [35] 본 발명은 세포시트의 다층 적층시, 세포 간 부착력을 우수하게 유지하여 고분자 지지체 없이 3차원적인 근조직 형성이 용이할 수 있다.
- [36] 본 발명에 따른 배양육 제조용 세포 배양 플랫폼은 세포 배양 플레이트에 용이하게 적용이 가능하며, 세포 배양을 위한 성장 인자가 플랫폼 내에 고정되어, 액상에 대해 노출이 최소화됨으로써, 활성이 유지된 채 세포에 제공되어 세포 증식을 개선할 수 있다. 따라서 적은 양의 영양소로도 세포에 효과적으로 전달 가능하여 세포의 대량 증식이 요구되는 배양육 제조를 위해 최적의 배양환경을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [37] 도 1은 본 발명의 (a) 비교예 1 및 (b) 실시예 2에 따른 배양육 제조방법 중 배양 과정을 도시한 것으로, 세포시트의 코팅 유무에 따라 근조직이 효과적으로 형성되는지 여부를 보여주는 비교 모식도이다.
- [38] 도 2는 본 발명의 (a) 비교예 1 및 (b) 실시예 2에 따라 세포시트의 양전하층 및 음전하층의 교대 적층 여부에 따른 기계적 강도의 차이를 보여주는 그래프이다.
- [39] 도 3 (a)는 본 발명의 실시예 1-2에 따른 가교결합된 다공성 나노필름(X-linked (CHI/CMC))의 제조과정을 간략히 나타낸 모식도이다.
- [40] 도 3 (b)는 본 발명의 실시예 1-3에 따른 배양육 제조용 세포배양 플랫폼 제조과정을 간략히 나타낸 모식도이다.
- [41] 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.

[42] 도 4 (b)는 본 발명의 실험에 1-2에 따른 가교결합된 다공성 나노필름(X-linked (CHI/CMC)) 및 비가교결합된 다공성 나노필름의 AFM 이미지를 비교 분석한 결과를 나타낸 것이다.

[43] 도 5는 가교결합된 다공성 나노필름의 6, 13, 30 BL 필름을 제작하여, C-PC 방출 특성을 평가한 그래프이다.

[44] 도 6 (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.

[45] 도 6 (b)는 비가교결합된 필름, 가교결합된 필름 및 C-PC가 혼입된 SEM 이미지를 나타낸 것이다.

[46] 도 7은 본 발명의 실험에 2에 따른 세포 증식 결과를 나타낸 그래프이다.

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

[48] 도 9는 본 발명의 실험에 4에 따라 세포시트의 DNA 정량 분석을 실시한 결과를 나타낸 그래프이다.

[49] 도 10은 본 발명의 실험에 2에 따른 각 그룹의 세포 증식 형태를 나타낸 광학 현미경 이미지이다.

[50] 도 11 (a)는 본 발명의 실험에 4에 따라 단층시트 및 4층 세포 시트에 대한 H&E 염색을 수행한 결과를 나타낸 이미지이고, (b)는 염색 영역의 백분율을 통해 밀도를 정량화한 결과를 나타낸 그래프이다.

[51] 도 12는 배양육의 조리 전과 조리 후의 모습을 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[52] 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.

[53] 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.

[54] 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.

- [55] 또한 본 발명의 명세서에서 사용되는 단수 형태는 문맥에서 특별한 지시가 없는 한 복수 형태도 포함하는 것으로 의도될 수 있다.
- [56] 이하 본 발명에 따른 배양육 제조방법에 대해 상세히 설명한다.
- [57] 본 발명에 따른 배양육 제조방법은 배양접시에 배양육 제조에 사용 가능한 세포를 배양하여 단일 세포시트를 형성하는 단계; 상기 단일 세포시트를 수득하는 단계; 상기 수득한 단일 세포시트를 코팅하여 세포시트 표면에 나노필름을 형성하는 단계; 상기 코팅된 단일 세포시트를 적층하여 다층의 세포시트를 형성하는 단계; 및 상기 적층된 세포시트들로부터 근육 조직이 형성되는 단계;를 포함한다.
- [58] 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.
- [59] 각 단계에 대하여 보다 구체적으로 설명하면 다음과 같다.
- [60] 우선 살아있는 동물에서 조직을 채취한 뒤 조직에서 상기 배양육 제조에 사용 가능한 줄기세포를 분리한다. 줄기세포의 추출 방식은 공지의 줄기세포 추출 방식이 적용될 수 있으므로, 상세한 설명은 생략한다. 줄기세포를 당업계에 공지된 세포 배양 방법을 통하여 배양한 후, 배양접시 표면의 전면을 덮을 정도의 고밀도로 단일층의 세포 번들이 형성되면, 32°C 이하로 저온처리하여 세포의 비접착성을 유도하여, 배양접시로부터 세포 번들을 분리한다. 또는 세포 스크래퍼를 통하여 배양접시로부터 단일 세포 번들을 분리한다. 이때 단일층의 세포 번들은 본 발명의 명세서에서 단일 세포시트라 명명할 수 있다.
- [61] 본 명세서에서 구체적으로 단일 세포시트는 하나 이상의 세포가 단일의 층으로 판상 배열되어 있는 것을 지칭하며, 상기과 같이 물리적 또는 화학적 방법으로 배양접시로부터 분리시키는 것이 가능하다.
- [62] 이후 얻어진 단층의 세포시트의 표면을 코팅하여 나노필름을 형성한다. 상기 코팅은 정전기적 인력, 반데르발스 힘, 소수성 결합, 수소결합 및 공유결합으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상을 이용하며, 이를 통해 다층의 나노필름을 형성할 수 있다.
- [63] 본 발명의 바람직한 일 구현예에 있어서, 상기 나노필름은 양전하성 물질 및 음전하성 물질이 교대로 적층되어 형성되는 것일 수 있다. 구체적으로 배양육 제조에 사용 가능한 세포를 배양하여 세포시트를 형성한 후, 2개의 상반되게 하전된 양전하성 물질을 포함한 제1코팅용액 및 음전하성 물질을 포함한 제2코팅용액 내에 세포시트를 교번적으로 침지시키는 단계를 포함한다. 제1코팅용액에 세포시트를 침지시켜 음전하를 띠고 있는 세포막 표면에 양전하층을 도입하고, 그 후 제2코팅용액에 침지시켜 양전하층 상에 음전하층을 적층함으로써, 상기 세포시트 표면상에 LBL(layer-by-layer) 조립이 수행되고,

이를 n회 반복하면서 다층의 나노필름이 형성된다.

- [64] 상기 양전하층 및 음전하층의 교차 결합을 통해 상반된 전하층이 정전기적 인력을 통해 안정하게 결합을 유지할 수 있고, 양전하성 물질 및 음전하성 물질의 수소결합에 의한 상호작용에 따라 세포시트와 세포시트 사이의 결합력을 더욱 강화시키며, 다층의 나노필름이 세포시트를 감싸, 장기간 세포를 안정한 상태로 보호할 수 있다.
- [65] 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 nm인 경우 세포 성장인자의 지속적인 방출을 유도할 수 있다. 상기 나노필름은 2개 이상의 층이며, 바람직하게는 4개 내지 40개의 층일 수 있다.
- [66] 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 세포시트 표면 또는 전하층에 약한 결합으로 적층된 물질을 제거하기 위한 단계를 의미하는 것으로, 제1코팅용액 또는 제2코팅용액과 동일한 용매를 사용하여 수행될 수 있다. 상기 세척 과정을 통해 세포시트 표면에 균일하고 빠른 코팅층 형성 효과를 달성할 수 있다.
- [67] 상기 제1코팅용액 또는 제2코팅용액은 세포 배양에 필요한 다수의 성장 인자, 예를 들어 EGF, IGF-1, PDGF, TGF- β , VEGF 및 bFGF 등을 추가적으로 함유할 수 있다.
- [68] 상기 양전하성 물질 및 음전하성 물질은 배양육 제조를 위하여 식용가능하여야 하고, 생체친화적인 유기 고분자 또는 무기물인 것이 좋다.
- [69] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 유기 고분자의 구체적인 예로서 양전하성 물질은 키토산, 키틴, 녹말, 콜라겐, 젤라틴, 피브리노겐, 실크피브로인, 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, 카라기난, 한천, 잔탄검, 아라비아검, 글루코만난, 카르복실메틸셀룰로오스(CMC) 및 타라검으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상일 수 있다. 바람직하게는 카르복실메틸셀룰로오스, 카라기난, 잔탄검 또는 한천일 수 있으나, 혼합검류 또는 음이온성 다당체 고분자라면 이에 특별히 제한되지 않는다.
- [70] 도 3(a)을 참고하여, 나노필름이 형성되는 단계를 설명할 수 있다.
- [71] 도 3(a)에 도시된 바와 같이, 양전하성 다당류 및 음전하성 다당류가 교차 적층되어 LbL 조립된 나노필름을 형성할 수 있다. 다당류는 수소 결합을 형성할

수 있는 작용기를 가진 천연 고분자로서, 바람직하게는 양전하성 다당류의 경우 NH_2 작용기를 포함하고, 음전하성 다당류의 경우 COOH 작용기를 포함할 수 있다. 구체적인 예를 들면, pH 4 내지 pH 5의 수용액에서 NH_2 는 NH_3^+ 로 되며, COOH 는 COO^- 로 되어, 각각 양으로 하전된 다당류 및 음으로 하전된 다당류가 정전기적 상호작용에 따라 교차로 적층되어 LbL조립으로 다층막을 형성하는 것이다.

- [72] 이때 상기 정전기적 상호작용에 의한 LbL 조립에 더하여, 각 다당류 고분자 층 사이에 가교결합을 유도하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 가교결합은 가교제에 의하여 유도되는 것으로서, 구체적인 일 예로서, EDC(Ethyl(dimethylaminopropyl)carbodiimide)/NHS(Hydroxysuccinimide)를 이용한 것일 수 있다. EDC/NHS 원리를 이용하여 음전하성 다당류의 에스테르 및 양전하성 다당류의 아민 사이에 안정적인 아미드 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 다중 기공이 있는 거친 형태의 구조를 나타내고, 이 경우 세포 성장 인자 등의 고분자 로딩 및 방출 거동이 더 활발하게 일어나는 이점을 제공할 수 있다.
- [73] 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.
- [74] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 세포시트 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.
- [75] 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 아가로스 포함하는 것일 수 있다.
- [76] 또한 본 발명의 일 구현예에 있어서, 세포시트 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.

- [77] 본 발명은 배양육 제조방법에 관한 것으로서, 세포의 대량 증식이 안정적으로 유도되어야 한다. 따라서 본 발명은 단일 세포 시트를 나노필름으로 코팅하는 단계; 및 보호층으로 코팅하는 단계;를 포함함으로써, 근아세포의 안정적인 대량 증식을 유도할 수 있다. 특히, 상기 나노필름 내부는 가교결합을 통해 다공성 구조를 형성하고, 세포 성장 인자 등의 혼입 및 고정화에 따라 안정적인 세포 성장 인자의 방출을 도모할 수 있고, 세포 성장 인자가 효과적으로 근아세포에 전달될 수 있다.
- [78] 구체적으로, 배양육 제조에 사용 가능한 줄기세포는 근세포로 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 세포시트 표면을 세포외 매트릭스(Extracellular matrix: ECM) 관련 고분자 소재로 코팅한 경우 다층으로 적층된 세포시트 간 지속적인 물리적 자극을 용이하게 전달할 수 있고, 근섬유의 단백질의 생성을 조절할 수 있다. 근섬유의 반복적인 당김과 풀림을 통하여, 콜라겐 생성이 증대되거나 감소될 수도 있다.
- [79] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 무기물은 필요에 따라 음전하층 및 양전하층 사이에 도입될 수 있다. 구체적으로 상기 무기물은 인산칼슘, 탄산칼슘, 실리카, 산화티타늄 등일 수 있고, 이에 특별히 제한되지 않고 생광물이면 사용 가능하다. 상기 무기물이 도입되는 경우 세포시트의 기계적 강도가 현저히 향상될 수 있다. 예를 들어, 상기 음전하층이 적층된 후, 무기물이 코팅되는 경우 표면 위 결정화가 용이하게 수행되어 세포시트 표면에 코팅된 연성인 고분자의 기계적 성질을 보완할 수 있다. 또한 다층의 세포시트 적층 후, 대량 증식 유도시 산을 처리하여 무기물을 분해하여 세포 분열 정도를 조절하는 것이 가능하다.
- [80] 구체적으로 줄기세포는 근아세포(myoblast)로 분화되고, 근아세포는 다시 증식 및 분화과정을 거쳐 근세포(myocyte)가 된다. 본 발명에 의할 때, 줄기세포는 근아세포로 대량 증식하여 세포시트를 형성하고, 세포시트의 코팅 과정을 통해 자기조직화에 의한 성장이 가능하다. 즉 세포 성장의 지지체 필요없이 코팅된 세포시트가 수직방향으로 다층 적층되면서 3차원적 세포시트가 정전기적 결합 또는 수소결합에 의하여 안정하게 유지될 수 있다.
- [81] 주로 뼈가 없이 사용되는 햄버거 패티나 소시지, 간고기(miced meat) 용도의 배양육 제조를 위해서는 스캐폴드에 분주하여 배양하는 방법을 이용할 수 있다. 다만 스테이크 등 구조화된 육류를 수득하기 위해서는 자기조직화에 의한 성장에 의한 것이 좋다. 자기조직화는 줄기세포로부터 아주 조직화된 근조직 및 배양육이 스스로 제조되는 것을 지칭하거나 기존의 근육조직을 배양기 내에서 증식시킴으로써 배양육을 제조하는 것을 말한다. 따라서 본 발명에 의한 경우 자기조직화에 의한 성장을 통하여 구조화된 육류를 수득할 수 있는 이점이 있다.

- [82] 근세포로 분화되고, 근조직으로 성장함에 따라 배양육에 가까워지는데, 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, 근세포의 형태, 기능 및 발달이 조절될 수 있다.
- [83] 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 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.
- [84] 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 (썬셋 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.
- [85] 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.

- [86] 또한, 본 발명은 상술한 배양육의 제조방법에 따라 제조된 배양육을 제공한다. 이때, 배양육은 닭고기, 돼지고기, 소고기, 염소고기, 양고기, 오리고기 또는 어류를 대체하는 것일 수 있다.
- [87] 또한 본 발명은 배양육 제조용 세포배양 플랫폼을 제공한다.
- [88] 상기 배양육 제조용 세포배양 플랫폼은 기판; 양전하성 물질 및 음전하성 물질이 교대로 적층된 다공성 코팅층; 및 보호층을 포함한다. 상기 다공성 코팅층은 양전하성 물질 및 음전하성 물질이 교대로 적층된 다층 필름인 것이 좋다. 구체적으로 양전하성 물질 및 음전하성 물질은 가교결합을 형성한 것일 수 있다.
- [89] 또한 상기 다공성 코팅층은 내부에 미세조류 유래 활성 성분을 포함할 수 있다. 상기 활성 성분은 세포 성장 인자로 작용할 수 있고, 구체적으로 C-피코시아닌일 수 있다.
- [90] 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.
- [91] 본 발명은 세포의 대량 증식이 요구되는 배양육을 제조하는 데 있어, 상기 C-피코시아닌을 세포 성장 인자로써 포함할 수 있다. C-피코시아닌을 포함함으로써, 동물유래의 혈청 사용을 저감하여 비용 효율적이며, 세포의 증식과 골수 조혈세포의 분화를 강화하여, 향상된 세포 증식 효과를 제공할 수 있다.
- [92] 또한 본 발명에 따른 배양육 제조용 세포배양 플랫폼은 세포 배양 플레이트에 용이하게 적용할 수 있고, 장기 배양 시 혈청 감소 환경에서 근아세포의 증식을 개선하는 효과를 제공한다.
- [93] 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.

발명의 실시를 위한 형태

- [94] [실시예 1] 배양육 제조용 세포배양 플랫폼 제조
- [95] 1-1. 다공성 나노필름 제조
- [96] 1 mg/ml 농도의 키토산 수용액(CHI, medium Mw, deacetylation = 75~85%, Sigma-Aldrich) 및 1 mg/ml 농도의 카르복실메틸 셀룰로오스 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) 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 기관 표면에 단일 이중층(BL) 필름이 형성되었다. 이 교차 증착을 n 회 반복하여 n 개의 BL로 구성된 (CHI/CMC) 필름을 제조하였다.

[97] 1-2. 가교결합된 다공성 나노필름 제조

[98] LbL 조립 후, 두 번 가교 반응을 도입하여 필름의 다공성 내부 구조를 얻었다. 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimide hydrochloride (EDC, $M_w \approx 191.71$, Daejung)/N-hydroxysulfosuccinimide (NHS, $M_w \approx 115.09$, Sigma-Aldrich) 화학을 1차 가교에 사용하였다. (CHI/CMC) 필름으로 코팅된 기관을 0.1 M EDC 및 2.5 mM NHS가 보충된 2-(N-모르폴리노) 에탄 설폰산 수화물(MES 완충액, $M_w \approx 195.2$, 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 기관을 2.5% 글루타르알데히드 용액($M_w \approx 25,000$, Sigma-Aldrich)에서 30분 동안 인큐베이션한 후, 탈이온수로 철저히 세척하여, 가교결합된 다공성 나노필름(X-linked (CHI/CMC))을 완성하였다.

[99] 1-3. 배양육 제조용 세포배양 플랫폼 제조

[100] 1X PBS를 용매로 하여, 0.5 mg/mL의 농도로 C-피코시아닌(C-PC) 용액을 제조하였다. 가교결합된 다공성 나노필름으로 코팅된 기관을 C-PC 용액에서 12시간 동안 실온에서 빛이 차단된 환경에서 인큐베이션하여 C-PC가 필름에 충분히 혼입(incorporation)되도록 하였다. 필름이 건조되는 동안 아가로스 0.1 w/v% 농도로 탈이온수에 용해시켰다. C-피코시아닌 캡핑층을 형성하기 위해 아가로스 용액을 cm^2 당 $25\mu\text{l}$ 로 건조된 필름에 적용하였다. 4 °C에서 준비된 필름을 경화시켜, 본 발명에 따른 배양육 제조용 세포배양 플랫폼(capped (CHI/CMC)/CPC)을 완성하였다.

[101] [실험예 1] 가교결합된 다공성 나노필름의 특성 평가

[102] 1-1. 가교결합된 다공성 나노필름(X-linked (CHI/CMC))의 FT-IR 스펙트럼 분석

[103] 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.

[104] (CHI/CMC)필름의 FT-IR 스펙트럼에서 COC, COH 및 CN에 해당하는 다당류 피크가 $1400\sim 1630\text{ cm}^{-1}$ 사이에서 관찰되었으며, OH 및 NH에 대한 중첩 피크도 $3200\sim 3500\text{ cm}^{-1}$ 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.

[105] 1-2. 가교결합된 다공성 나노필름(X-linked (CHI/CMC))의 AFM 이미지 분석

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

형태를 보였다.

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

[108] C-피코시아닌(C-PC)의 방출 실험

[109] 실시예 1에 따라 제조된 필름 샘플을 OHP 기판에 코팅하고 세포 배양 플레이트에 적용한 후, 배양된 murine C2C12 근아세포(passage 10)를 8×10^3 cells/well의 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.

[110] 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($93.22 \mu\text{g}/\text{mL}$)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.

[111] 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 7에 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.

[112] [표 1]

[113]

	Initial	FBS 10%	FBS 5%	Uncapped	Capped film	Exo-1	Exo-2
Number of cells ($\times 10^4$ 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

[114] 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 10에 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.

[115] **[실시예 2] 단일 세포시트를 적층한 배양육 제조**

[116] 실시예 1에 따라 제조된 배양육 제조용 세포배양 플랫폼을 준비하고, 35 mm 세포 배양접시 기준 2×10^6 cells/dish의 murine C2C12 근아세포를 시딩(seeding)하였다. 이후, 37 °C 및 5% CO₂ 조건에서 12일동안 배양하여 단일 세포시트를 형성하면, 단일 세포시트를 또 하나의 세포시트에 옮겨 물리적으로 중첩시킨 후 동일한 성장 조건에서 30분 동안 인큐베이션하여 시트로부터의 세포 대 세포 접합(cell-to-cell junctions)이 진행되도록 하였으며, 위의 과정을 통해 다층의 세포시트를 얻었다.

[117] 적층된 세포시트에 1X PBS 한 방울을 첨가하고, 젖은 시트를 4 °C에서 24시간 동안 보관하였다. 이후, 준비된 세포시트에 10 mg/ml 농도의 비트 추출물(CJ제일제당) 수용액을 첨가하고 실온에서 30분 동안 보관하였다. 100~120 °C 에서 붉게 염색된 시트를 굽고 120~140 °C에서 튀겼다. 굽고 튀겨진 배양육 모델 이미지가 도 12에 도시되었다. 조리하기 전의 배양육은 생고기와 유사했고, 구운 모델의 경우 살라미 소시지와 유사한 형태를 보였다. 기름을 많이 넣어 튀긴 모델의 경우 쉽게 타지만 육포와 유사한 형태가 관찰되었다.

[118] **[비교예 1] 코팅하지 않은 세포시트로부터 배양육 제조**

[119] 세포시트 표면을 코팅하는 단계를 거치지 않은 것을 제외하면 실시예 1과 동일한 방법으로 배양육을 제조하였다.

[120] 비교예 1에 따라 코팅하지 않은 세포시트의 경우 배양육 제조를 위하여 다층으로 적층하는 과정에서 세포가 유실되며, 세포 밀도가 현저히 낮아지는 결과가 나타났다. 이는 근육 조직으로의 분화 효율의 감소로 이어졌으며, 배양육이 제대로 형성되지 않았음을 확인하였다. 세포시트를 코팅한 실시예 1 내지 실시예 3에 따라 제조된 배양육의 경우 단단한 근육 조직으로 분화하였으며, 지방이 근육 사이에 삽입된 형태로 자리잡아, 다지기 전의 배양육은 육안으로 실제 육류 조직과 유사한 조직이 관찰되었다.

[121] **[실험예 3] 세포시트의 기계적 강도 평가**

[122] 실시예 1 및 비교예 1에 따라 1회 양전하층/음전하층 코팅(2-layer), 2회 양전하층/음전하층 코팅(4-layer), 3회 양전하층/음전하층 코팅(6-layer) 및 코팅하지 않은 세포시트(control)의 기계적 강도를 평가하였다.

[123] 세포시트의 강도는 미세 평활 재료의 압축 강도 시험을 위해 설계된 압축 분석기로 평가되었다. 인텐터(indenter)는 4.9N load cell 및 3 mm 직경의 평평한 원통 스테인리스강(stainless steel) 프로브로 장착되었다. 세포시트에 힘을 수직으로 가하고 측정 속도를 10 μ m/sec로 설정하였다. 4.9 mN 미만 깊이

세포시트의 초기 깊이(L0)로 간주하고 측정 팁이 플레이트 접시에 도달할 때의 깊이를 시트의 총 깊이 (Lt)로 간주하였다. 세포시트의 길이 L은 Lt와 L0의 차이로 계산되었고, 측정된 각 깊이는 L로 정규화되었다. 세포시트의 기계적 특성은 세포시트의 각 점에 가해진 압축력 (N)으로부터 얻어졌다. 압축 계수는 응력-변형 곡선(stress-strain curve)을 사용하여 보정되었고 Oliver/Pharr 수학적 모델에 의한 모듈러스를 얻기 위해 압입 측정으로부터 얻은 Load-displacement 데이터를 사용하였다.

- [124] 도 2는 상기 기계적 강도를 평가한 결과를 나타낸 것으로서, 코팅하지 않은 세포시트에 비하여 다층으로 세포시트를 코팅하는 경우 세포시트의 기계적 강도가 향상됨을 확인할 수 있다. 4-layer 및 6-layer의 경우 2-layer로 시트 표면을 코팅한 경우보다 현저히 강도가 증가된 결과를 보인다.
- [125] **[실험예 4] 세포시트의 밀도 및 분화 평가**
- [126] 코팅하지 않은 세포시트와 코팅된 세포시트 내 세포 밀도 및 세포 기능을 비교하기 위하여, 세포 시트에 대한 H&E 염색을 분석하여 각 세포시트의 밀도를 정량화하였다. 먼저 세포 배양 플레이트의 벽에 capped(CHI/CMC)/CPC 필름이 코팅된 OHP 기판을 도입한 다음 단일 세포 시트를 준비하였다. 10일동안 배양한 후, 단층 또는 4층 세포 시트에 대하여 헤마톡실린(Haemotoxylin) 및 에오신(Eosin) 염색(H&E 염색)을 수행하고, DNA 정량을 분석(Quant-iT™ PicoGreen dsDNA assay kit, Invitrogen)하였다.
- [127] H&E 염색 이미지는 도 11(a)에 도시되었다. 헤마톡실린은 핵을, 에오신은 세포질을 염색하며, 세포 시트의 염색된 영역이 많고 빈 공간이 적을수록 세포 시트의 밀도가 높은 것으로 간주할 수 있다. 세포 시트의 밀도는 각 샘플의 180μm X 180μm의 영역에서 염색된 영역의 백분율을 계산하여 정량화하였다. 단층 및 4층 세포 시트는 모두 대조군에 비해 C-PC 전달 플랫폼을 사용한 그룹에서 더 높은 염색 수준을 나타냈다. 이러한 결과는 플랫폼에서 방출된 영양 인자가 지속적으로 영양을 제공하여, 세포 노화 및 세포 사멸을 억제한다는 것을 시사한다.
- [128] DNA 정량 분석을 위해 준비된 세포 시트를 0.5 mg/ml Proteinase K, EDTA 용액(1X PBS 중 5 mM EDTA) 및 0.1% Triton-X로 구성된 200 μ/ml 용해물 완충액에서 3시간 동안 분해하고, 작업용액(시약:완충액=1:200)을 스탠다드 및 분해된 세포시트 용액에 적용하였다. 샘플은 마이크로플레이트 리더(SpectraMax ABS, Molecular Devices)를 이용하여 분석하였다. 그 결과는 도 7에 도시되었다. 대조군 및 세포배양 플랫폼이 적용된 군의 세포 시트에는 각각 1143 및 1326 ng의 DNA가 포함되어, 세포배양 플랫폼이 적용된 군의 세포 시트에 더 많은 양의 DNA가 있음을 확인할 수 있었다.
- [129] 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.

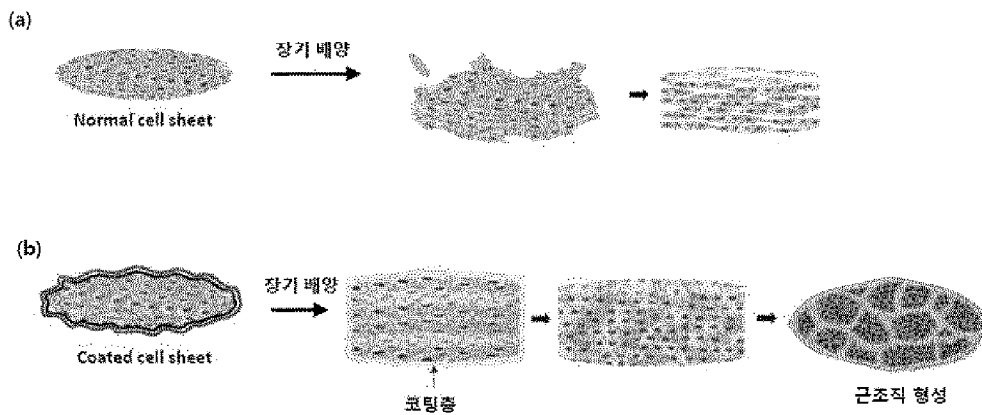
청구범위

- [청구항 1] 배양육 제조에 사용 가능한 세포를 배양하여 단일 세포시트를 형성하는 단계;
 상기 단일 세포시트를 수득하는 단계;
 상기 수득한 단일 세포시트를 코팅하여 세포시트 표면에 나노필름을 형성하는 단계;
 상기 코팅된 단일 세포시트를 적층하여 다층의 세포시트를 형성하는 단계; 및
 상기 적층된 세포시트들로부터 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 물질은 키토산, 녹말, 콜라겐, 젤라틴, 피브리노젠, 실크피브로인, 카제인, 엘라스틴, 라미닌, 및 피브로넥틴으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상인, 배양육 제조방법.
- [청구항 6] 제 4항에 있어서,
 상기 음전하성 물질은 히알루론산, 알지네이트, 타닌산, 리그닌, 셀룰로오스, 헤파린, 카라기난, 한천, 산탄검, 아라비아검, 글루코만난, 카르복실메틸셀룰로오스(CMC) 및 타라검으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상인, 배양육 제조방법.
- [청구항 7] 제 1항에 있어서,
 상기 나노필름의 두께는 50 내지 5000 nm인, 배양육의 제조방법.
- [청구항 8] 제 1항에 있어서,
 상기 나노필름을 형성하는 단계 이후, 보호층을 형성하는 단계를 포함하는, 배양육의 제조방법.
- [청구항 9] 제 1항에 있어서,

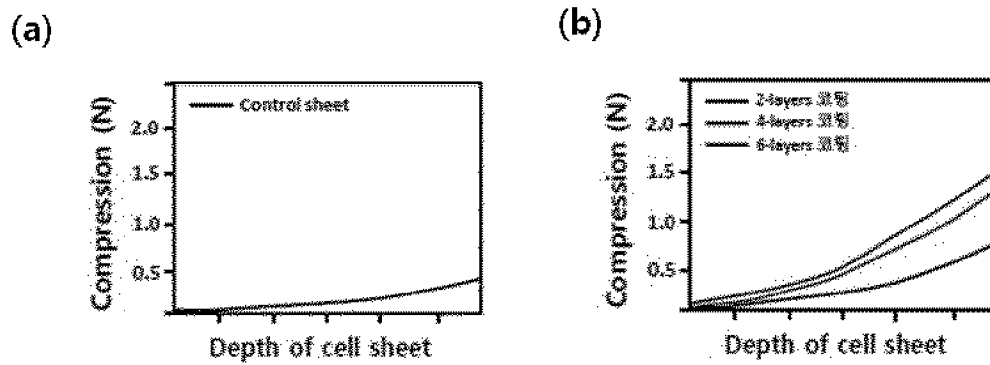
상기 코팅된 세포의 배양시 초음파, 전류, 전자기장, 자기장 또는 이들의 조합된 자극을 처리하는 배양육의 제조방법.

- [청구항 10] 제 1항에 있어서,
상기 나노필름을 형성하는 단계 이후, 세포 성장 인자를 첨가하는 단계를 더 포함하는, 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] 기관; 양전하성 물질 및 음전하성 물질이 교대로 적층된 다공성 코팅층; 및 보호층을 포함하는, 배양육 제조용 세포배양 플랫폼.
- [청구항 14] 제 13항에 있어서,
상기 다공성 코팅층은 양전하성 물질 및 음전하성 물질이 가교결합된 것인, 배양육 제조용 세포배양 플랫폼.
- [청구항 15] 제 13항에 있어서,
상기 다공성 코팅층은 C-피코시아닌을 포함하는, 배양육 제조용 세포배양 플랫폼.

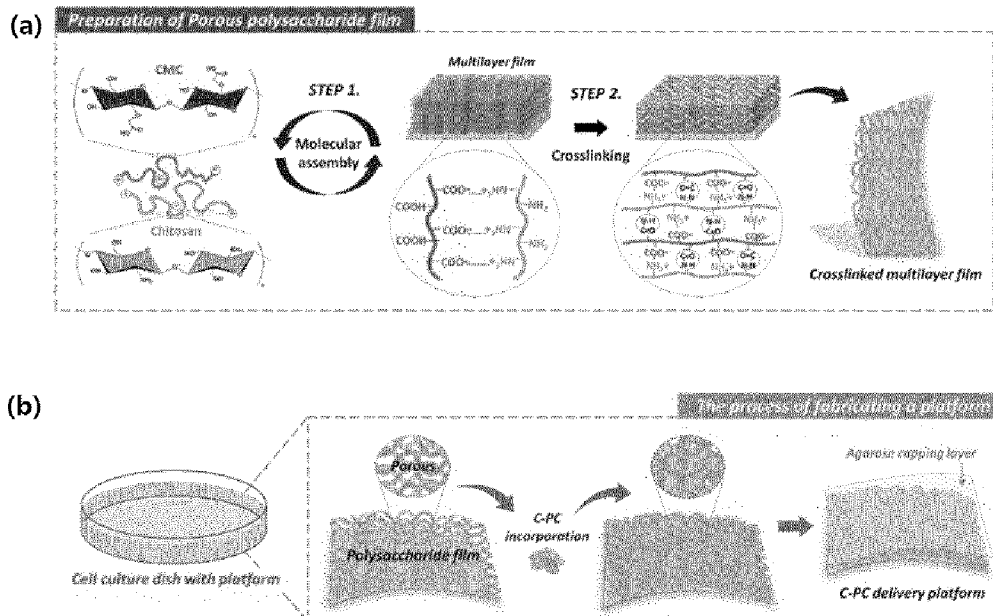
[도1]



[도2]

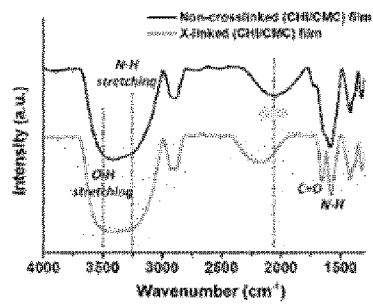


[도3]

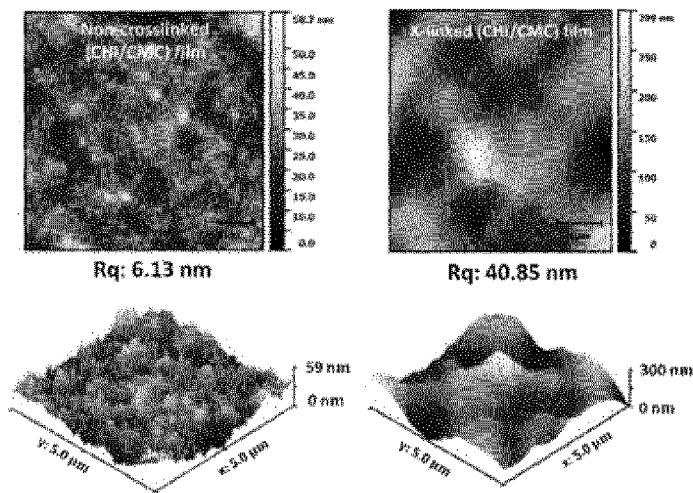


[도4]

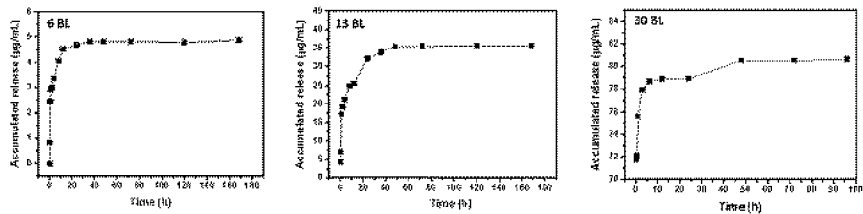
(a)



(b)

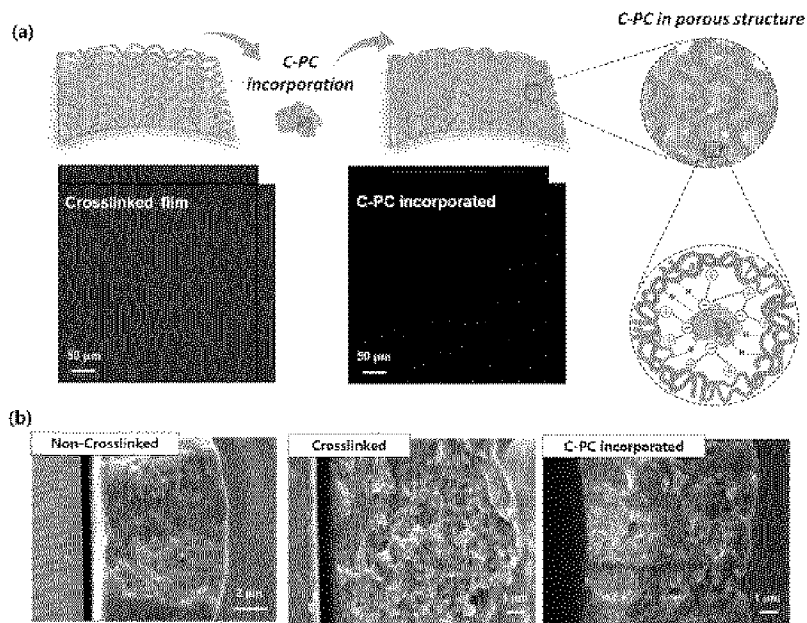


[도5]

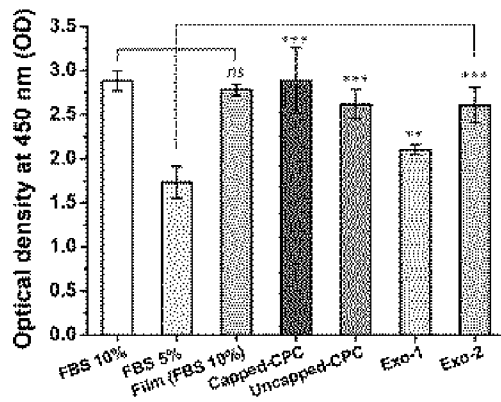


	Thickness	Amount of released C-PC	Release behavior
6 BL film	27.94 nm	4.87 μg/mL	Saturation after 24h
13 BL film	800 nm	36.57 μg/mL	Saturation after 48h
30 BL film	2.75 μm	81.54 μg/mL	Saturation after 48h

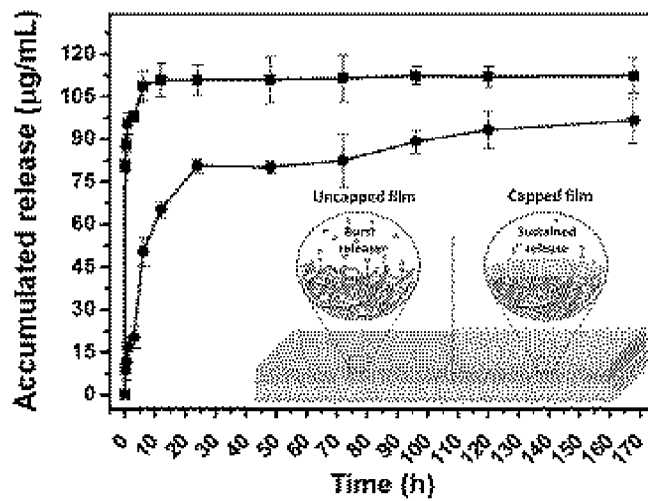
[도6]



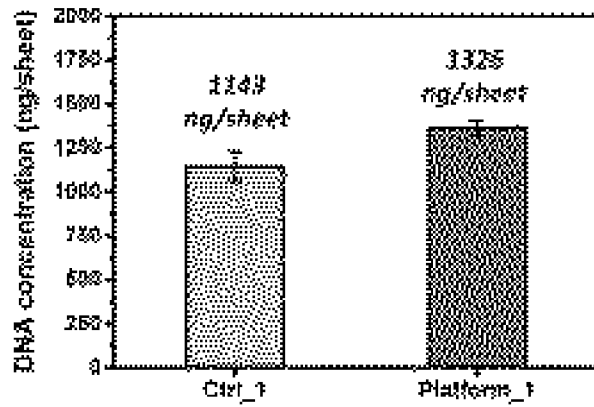
[도7]



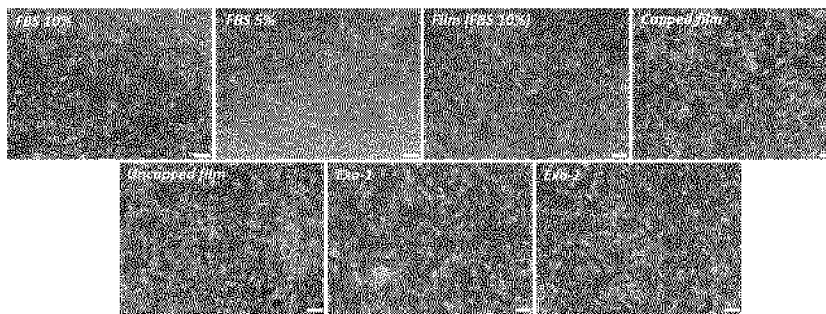
[도8]



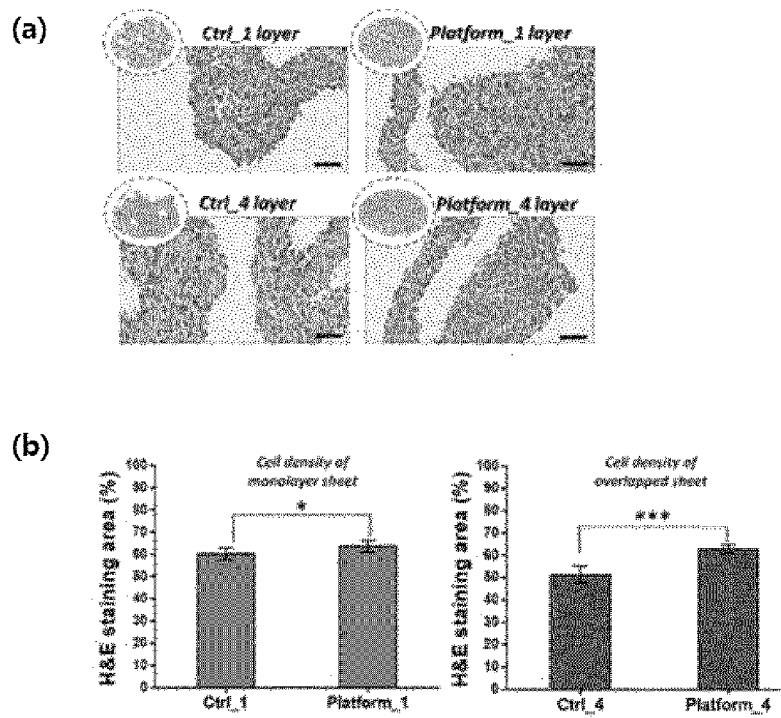
[도9]



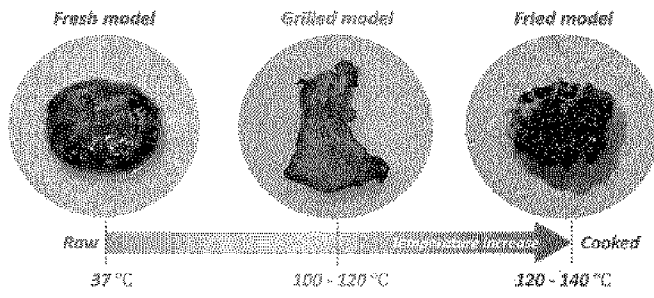
[도10]



[도11]



[도12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/009506

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/071(2010.01)i; **C12N 13/00**(2006.01)i; **C12M 3/00**(2006.01)i; **C12M 1/12**(2006.01)i; **C12M 1/42**(2006.01)i;
A23L 13/00(2016.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 5/071(2010.01); A61L 27/20(2006.01); A61L 27/36(2006.01); C12N 5/00(2006.01); C12N 5/06(2006.01);
C12N 5/077(2010.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 배양육(cultured meat), 세포시트(cell sheets), 코팅(coating), 나노필름(nanofilm),
다공성 코팅층(porous coating layer), 보호층(protective layer), 세포배양(cell culture), 플랫폼(platform)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2017-0100693 A (CHUNG ANG UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 05 September 2017 (2017-09-05) See claims 1-9; and examples 1 and 2.	1-15
A	KR 10-2017-0099033 A (CHUNG ANG UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 31 August 2017 (2017-08-31) See claims 1-7; and figure 1.	1-15
A	박윤제, 줄기세포를 이용한 배양육 생산 시스템(in vitro meat production system) 기술 개발. 2019년 미래식품 기초연구과제총서. 2019, pp. 100-130. non-official translation (PARK, Yoon-Jae. Development in vitro meat production system using stem cells. 2019 Final Report of Future Food Basic Research Project.). See entire document.	1-15
A	US 2006-0281173 A1 (FUKUDA, K. et al.) 14 December 2006 (2006-12-14) See entire document.	1-15



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
“D” document cited by the applicant in the international application
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

01 November 2021

Date of mailing of the international search report

01 November 2021

Name and mailing address of the ISA/KR

**Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208**

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/009506**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BEN-ARYE, T. et al. Tissue Engineering for Clean Meat Production. Frontiers in Sustainable Food Systems. June 2019, vol. 3, document 46, pp. 1-19. See entire document.	1-15
PX	PARK, S. et al. Chitosan/Cellulose-Based Porous Nanofilm Delivering C-Phycocyanin: A Novel Platform for the Production of Cost-Effective Cultured Meat. ACS Appl. Mater. Interfaces. electronic publication 29 June 2021, vol. 13, pp. 32193–32204. See entire document.	13-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2021/009506

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2017-0100693	A	05 September 2017	KR	10-1815370	B1	09 January 2018
KR	10-2017-0099033	A	31 August 2017	None			
US	2006-0281173	A1	14 December 2006	AT	450601	T	15 December 2009
				CA	2539613	A1	31 March 2005
				CN	1852972	A	25 October 2006
				EP	1669440	A1	14 June 2006
				EP	1669440	A4	28 March 2007
				EP	1669440	B1	02 December 2009
				JP	2009-011322	A	22 January 2009
				JP	4193184	B2	10 December 2008
				JP	4284563	B2	24 June 2009
				KR	10-1001117	B1	14 December 2010
				KR	10-2006-0091301	A	18 August 2006
				WO	2005-028638	A1	30 November 2006
				WO	2005-028638	A1	31 March 2005

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 5/071(2010.01)i; C12N 13/00(2006.01)i; C12M 3/00(2006.01)i; C12M 1/12(2006.01)i; C12M 1/42(2006.01)i; A23L 13/00(2016.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 5/071(2010.01); A61L 27/20(2006.01); A61L 27/36(2006.01); C12N 5/00(2006.01); C12N 5/06(2006.01); C12N 5/077(2010.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 배양육(cultured meat), 세포시트(cell sheets), 코팅(coating), 나노필름(nanofilm), 다공성 코팅층(porous coating layer), 보호층(protective layer), 세포배양(cell culture), 플랫폼(platform)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2017-0100693 A (중앙대학교 산학협력단) 2017.09.05 청구항 1-9; 및 실시예 1, 2	1-15
A	KR 10-2017-0099033 A (중앙대학교 산학협력단) 2017.08.31 청구항 1-7; 및 도면 1	1-15
A	박윤제, '줄기세포를 이용한 배양육 생산 시스템(in vitro meat production system) 기술 개발', 2019년 미래식품 기초연구과제총서, 2019, 페이지 100-130 전체 문헌	1-15
A	US 2006-0281173 A1 (FUKUDA, K. 등) 2006.12.14 전체 문헌	1-15
A	BEN-ARYE, T. 등, 'Tissue Engineering for Clean Meat Production', Frontiers in Sustainable Food Systems, 2019.06., 3권, 문헌 46, 페이지 1-19 전체 문헌	1-15
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2021년11월01일(01.11.2021)		국제조사보고서 발송일 2021년11월01일(01.11.2021)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 정다원 전화번호 +82-42-481-5373

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
PX	PARK, S. 등, 'Chitosan/Cellulose-Based Porous Nanofilm Delivering C-Phycocyanin: A Novel Platform for the Production of Cost-Effective Cultured Meat', ACS Appl. Mater. Interfaces, 전자공개 2021.06.29, 13권, 페이지 32193-32204 전체 문헌	13-15

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2021/009506

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2017-0100693 A	2017/09/05	KR 10-1815370 B1	2018/01/09
KR 10-2017-0099033 A	2017/08/31	없음	
US 2006-0281173 A1	2006/12/14	AT 450601 T	2009/12/15
		CA 2539613 A1	2005/03/31
		CN 1852972 A	2006/10/25
		EP 1669440 A1	2006/06/14
		EP 1669440 A4	2007/03/28
		EP 1669440 B1	2009/12/02
		JP 2009-011322 A	2009/01/22
		JP 4193184 B2	2008/12/10
		JP 4284563 B2	2009/06/24
		KR 10-1001117 B1	2010/12/14
		KR 10-2006-0091301 A	2006/08/18
		WO 2005-028638 A1	2006/11/30
		WO 2005-028638 A1	2005/03/31