



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0002382
(43) 공개일자 2018년01월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61C 8/02 (2006.01) A61L 27/20 (2006.01)
A61L 31/04 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61C 8/0006 (2013.01)
A61L 27/20 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0081827
(22) 출원일자 2016년06월29일
심사청구일자 2017년04월06일

(71) 출원인
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)
(72) 발명자
김수관
광주광역시 서구 풍암신암로 31 104동 503호
김재성
광주광역시 북구 일곡로 80번지 102동 1401호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인(유한)유일하이스트, 김은구, 송해모

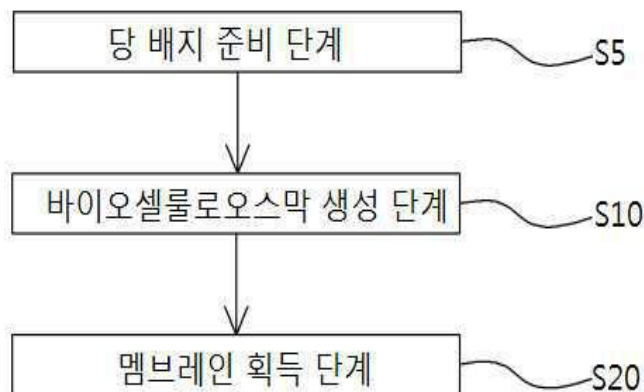
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막 및 그 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막 및 그 제조 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 단순한 공정 과정으로 경제적 대량생산이 용이하고, 나노 섬유로 구성된 3차원적 망상 구조를 형성함으로써 다공성을 확보하고, 치과의료용 매식재료로써 우수한 물리·화학적 특성 및 생물학적 안전성을 지녀 식품, 화장품 및 의약품 산업의 신소재로 각광받고 있는 미생물 바이오셀룰로오스(Microbial cellulose)를 기반으로 한 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막 및 그 제조 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61L 31/042 (2013.01)

A61L 2430/02 (2013.01)

A61L 2430/12 (2013.01)

(72) 발명자

이숙영

광주광역시 남구 봉선중앙로 46, 108동 201호

정이라

광주광역시 서구 화정로21번길 8-9(쌍촌동) 두리빌
라 303

김성주

광주광역시 서구 엄화로83번길 3 엄주주공아파트
105-102

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1415145176

부처명 산업통상자원부

연구관리전문기관 한국산업기술진흥원

연구사업명 산업기술거점기관지원

연구과제명 과실 낙과소재 기반 치과의료용 비흡수성 차단막 개발

기 여 율 1/1

주관기관 (주)덴티스

연구기간 2015.07.01 ~ 2016.06.30

명세서

청구범위

청구항 1

과일 등과 같은 식물소재를 기반으로 과육을 이용한 당성분의 배지에 미생물 바이오셀룰로오스 합성균주인 초산균 *Gluconacetobacter xylinus*를 접종하여 현탁배양과 정치배양을 통해 생성된 바이오셀룰로오스 차단막을 소재로 제조된 멤브레인을 포함하는 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막.

청구항 2

배양배지내 균 농도가 적정량이상이면 펠리클(pellicle)과 멤브레인(membrane) 형성이 거의 동일하게 형성되는 것을 이용한 당 배지를 준비하는 단계와;

당성분의 배지를 가압멸균한 후 초산균을 접종하여 일정기간 현탁배양하여 박막을 생성하고, 상기 박막을 일정기간 정치배양하여 상기 박막 주변에 소정의 두께를 갖는 바이오셀룰로오스막을 생성하는 바이오셀룰로오스막 생성 단계와;

상기 바이오셀룰로오스막에 부착된 미생물 및 불순물을 제거하고, 건조시켜 바이오셀룰로오스 멤브레인을 획득하는 멤브레인 획득 단계를 포함하는 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막 제조 방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 당 배지를 준비하는 단계는, 과일 착즙액을 121℃의 온도로 15분간 고압습윤멸균한 후 부유물을 거름종이와 깔대기로 분리하고 당도를 적정량으로 맞춰 균 접종을 하는 것을 특징으로 하는 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막 제조 방법.

청구항 4

제2항 또는 제3항에 있어서,

상기 과일은, 배, 사과, 자두, 포도, 아오리 사과 등일 수 있으나 이에 제한되지 않는 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막 제조 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 과일은 자연 재해로 낙과된 미성숙, 성숙 배를 이용해도 유효한 것을 특징으로 하는 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 미생물 기반 물질 변환공정을 통한 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막 및 그 제조 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 과일 등과 같은 식물소재를 이용해 비흡수성 차단막소재 미생물 셀룰로오스를 제조하여, 바이오셀룰로오스에 대한 물리 화학적 특성, 생물학적 안정성 및 치주골 재생 유도능 등에 대한 평가방법 등을 분석함으로써 생체이식 치과의료용 바이오셀룰로오스 차단막 및 그 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 생활수준 향상에 따른 임플란트(Implant) 시술환자의 증가로, 구강 내 매식 재료 개발에 대한 수요가 급격히 증가하고 있는 실정이다.

[0003] 임플란트 시술 시 구강 내 소실된 골의 재생 및 시술 방법으로는 주로 골 이식재(Bone graft materials)와 차단

막(Barrier membrane)을 이용한 골유도재생술(Guided Bone Regeneration, GBR)이 시행되고 있다.

- [0004] 골유도재생술은 임플란트 식립이 요구되는 골 결손 부위에 골 이식재를 식립한 후 차단막을 덮어 뼈가 자라도록 유도해 주는 기술로서 임플란트 이식 성공률을 결정하게 된다.
- [0005] 따라서, 임플란트 시술 시 필수적으로 요구되는 매식재료 중 하나인 차단막은 골 결손부위에 이식된 골 이식재의 이동을 억제하고 불필요한 연조직 세포의 증식은 배제하며 골 재생에 필요한 세포를 선택적으로 접근시킴으로써 골 결손부위의 골 재생과 골 침착을 돕는 지지체 역할을 한다.
- [0006] 치과의료용 차단막은 분해되는 특성에 따라 흡수성과 비흡수성 차단막으로 구분되어진다.
- [0007] 흡수성 차단막은 골 결손부위에 이식 후 자연적으로 구강 내에서 생분해됨으로써 차단막 제거를 위한 2차적 수술이 필요 없다는 점과 조작이 비교적 용이하다는 장점을 가지고 있는 반면, 비흡수성 차단막에 비하여 견고성이 낮아 공간 유지력이 저하되거나 결손부의 외형이 좋지 않고 골 이식재 등의 도움이 없다면 조직 재생의 양이 제한될 수 있다는 한계점을 가지고 있다.
- [0008] 또한 구강 내 이식 후 빠른 생분해는 완전한 골 회복이 어려울 가능성이 존재하고 중간 부산물이 국소적인 조직 반응을 일으킬 수 있다는 한계점을 지닌다.
- [0009] 한편 비흡수성 차단막은 흡수가 되지 않음으로써 충분한 조직 재생을 유도하지만 차단막을 제거하는 2차 수술이 필요하다는 단점을 지닌다.
- [0010] 비흡수성 차단막은 골 회복까지 완벽히 제 기능을 수행하여 임상적 예후가 좋다는 측면으로 인해 임상에서 선호하는 차단막 종류이다.
- [0011] 그러나 비흡수성 차단막은 합성공정이 매우 복잡한 고가의 고어텍스 제품소재로, 임플란트 이식이 필요한 환자에게 치과치료비용 상승 원인으로 작용한다는 한계점을 지닌다.
- [0012] 따라서, 비흡수성 차단막으로써 사용되고 있는 고가의 고어텍스 소재의 치과의료용 차단막을 대체하기 위하여 우수한 생체적합성, 조직접합성, 세포차단능, 공간유지능, 우수한 영양분 전달능, 다공성 및 임상적 조작 용이성 등과 더불어 제조공정 단순화 및 대량생산이 가능한 천연소재 기반 경제적인 치과의료용 차단막의 개발이 필요한 실정이다.
- [0013] 차단막(차폐막)과 관련한 종래기술로 등록특허공보 제10-1281723호(공고일자: 2013.07.04.)에는 "생체활성인자로 개질된 조직재생 유도용 생체고분자/실리카겔 유무기 복합 차폐막 및 그 제조방법"이 개시되어 있는데, 이는 졸겔법(sol-gel)과 메탄올, 에탄올 첨가를 통하여 만들어진 막을 생체활성인자가 포함된 완충용액 담지한 후, 섭씨 40도의 가압기로 압축하여 제조된 막으로 다공성 구조를 가지고 있는 것을 특징으로 한다.
- [0014] 차단막과 관련된 다른 종래기술로 등록특허공보 제10-1183961호(공고일자: 2012.09.27.)에는 "실리콘백질을 이용한 치주 골조직유도 재생용 차폐막 및 제조방법"이 개시되어 있고, 등록특허공보 제10-1400668호(공고일자: 2014.05.30.)에는 "펩타이드에 의한 표면활성형 콜라겐 차폐막"이 개시되어 있으며, 등록특허공보 제10-0180585호(공고일자: 1999.03.20.)에는 "치주조직 재생용 생분해성 차폐막 및 그 제조방법"이 개시되어 있고, 등록특허공보 제10-1260757호(공고일자: 2013.05.06.)에는 "다중층 흡수성 치주조직 재생 유도막"이 개시되어 있으며, 등록특허공보 제10-1133644호(공고일자: 2012.04.10.)에는 "해양 멧게류 피부 각질로부터 생활성 셀룰로오스막의 제조방법 및 이에 의해 얻어지는 생활성 셀룰로오스 막"이 개시되어 있다.
- [0015] 한편, 바이오셀룰로오스는 당성분의 배지와 초산균만 있다면 간단한 생산과정으로 대량생산할 수 있으며, 미생물 셀룰로오스는 나노 구조적 특성과 수분 보유능, 생체적합성 등의 유효한 특성을 가지고 있어서 다양한 분야에서 바이오셀룰로오스를 기반해 제품 개발을 위한 연구가 이루어지고 있다.
- [0016] 바이오셀룰로오스와 관련된 종래기술로 등록특허공보 제10-1399646호(공고일자: 2014.06.02.)에는 "감귤유래의 박테리아 셀룰로오스를 주재료 하는 생분해성 및 무독성 필름타입의 의료용 드레싱 제재"가 개시되어 있고, 등록특허공보 제10-0815182호(공고일자: 2008.03.19.)에는 "금속 나노입자를 이용한 미생물 셀룰로오스를 주성분으로 하는 화장품 착색 마스크 팩 및 이의 제조방법"이 개시되어 있으며, 공개특허공보 제10-2012-0098378호(공개일자: 2012.09.05.)에는 "천연 추출물을 함유하는 미생물 셀룰로오스, 이를 포함하는 화장품용 팩 및 이들의 제조방법"이 개시되어 있고, 등록특허공보 제10-1407348호(공고일자: 2014.06.17.)에는 "천연 과립분말이 함유된 바이오셀룰로오스 팩의 제조방법"이 개시되어 있으며, 등록특허공보 제10-1400674호(공고일자: 2014.06.19.)에는 "방사선 이용 생체분자 도입용 미생물 셀룰로오스 나노섬유 및 제조방법"이 개시되어 있다.

- [0017] 미생물 유래 셀룰로오스 막과 관련된 종래기술의 특징을 살펴보면, *Gluconacetobacter* sp., *Acetobacter xylinum*, *Lactobacillus rhamnosus* 등의 균주들을 이용하였으며, 이들 균주를 배양하기 위한 배지성분으로 식물성 추출물을 첨가하였으며, 균의 배양결과로 생성된 셀룰로오스를 HCl 또는 아크릴산 등으로 반복처리하였으며, 막의 형태를 제조하기 위한 방법으로는 셀룰로오스를 마쇄하거나 압착기 등을 사용하였고, 목적에 따라서는 셀룰로오스에 금속나노입자를 첨가하거나 감마선을 조사하는 방법 등을 사용하였다.
- [0018] 하지만, 종래의 기술들로 제조된 셀룰로오스 막은 의료용 드레싱 제재, 미용 마스크 팩, 조직공학용 지지체로 사용하는 것을 주요 목적으로 하고 있어 치과의료용 차단막과는 차이가 있다.
- [0019] 또한 차단막과 관련한 종래기술을 살펴보면, 해양 멧게류 피부를 주요 소재로 하여 제조된 셀룰로오스 막으로 창상이나 화상 등에 의해 생긴 상처에 대한 항균, 상처보호, 상처 치유촉진 등에 효과적으로 사용가능한 생활성 막이며, 그 밖의 기술들은 생체고분자 & 실리카겔이나 실칸단백질 또는 펩타이드 부착 콜라겐 또는 폴리글리콜산(PGA) 또는 PEG 유래 수화젤 등을 주요 소재로 한 비셀룰로오스성 막에 관한 것이다.
- [0020] 또한 치과의료용 차단막과 관련하여 종래의 기술을 살펴보면 생분해성 재료인 콜라겐과 PEG유래 수화젤이 다중층으로 결합하여 기존의 단층 흡수성 차폐막의 단점을 보완하는 흡수성 복합 차폐막으로 치주조직 재생을 유도 효과가 있으나 이는 미생물 유래 셀룰로오스 막이 아닌 비셀룰로오스성 막에 관한 것이다.
- [0021] 또한 종래의 의료용 차폐막 제품들의 원료소재는 대다수 합성물이어서 생체적합성이 저하되는 단점이 있으며, 천연물 유래 콜라겐막의 경우엔 분해력이 빨라 차폐막으로서이 기능성이 낮다는 한계가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0022] 본 발명은 다양한 특성을 지닌 바이오셀룰로오스를 치과 의료용 차단막으로 사용하기 위하여 안출된 것으로, 본 발명의 목적은 폐기되는 낙과의 재활용을 통한 과수농과의 경제성확보, 간단한 제조과정과 임상적인 조작으로 생물학적 안정성 및 가격 경쟁력을 확보할 수 있는 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막을 제공하여 치과 의료용 차단막의 국산화 및 수입대체로 치과 의료비용 부담을 완화시키는 데에 있다.

과제의 해결 수단

- [0023] 본 발명에 따른 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막은, 과일 등과 같은 식물소재를 기반으로 과육을 이용한 당성분의 배지에 미생물 바이오셀룰로오스 합성균주인 초산균 *Gluconacetobacter xylinus*를 접종하여 현탁배양과 정치배양을 통해 생성된 바이오셀룰로오스 차단막을 소재로 제조된 것을 특징으로 한다.
- [0024] 또한, 본 발명에 따른 치과 의료용 바이오 셀룰로오스 차단막 제조 방법은, 배양배지내 균 농도가 적정량이상이면 펠리클(pellicle)과 멤브레인(membrane) 형성이 거의 동일하게 형성되는 것을 이용한 당 배지를 준비하는 단계, 당성분의 배지를 가압멸균한 후 초산균을 접종하여 일정기간 현탁배양하여 박막을 생성하고, 상기 박막을 일정기간 정치배양하여 상기 박막 주변에 소정의 두께를 갖는 바이오셀룰로오스막을 생성하는 바이오셀룰로오스 막 생성 단계 및 상기 바이오셀룰로오스막에 부착된 미생물 및 불순물을 제거하고, 건조시켜 바이오셀룰로오스 멤브레인을 획득하는 멤브레인 획득 단계를 포함한다.
- [0025] 또한, 본 발명에 따른 치과 의료용 바이오 셀룰로오스 차단막 제조 방법은, 상기 당 배지를 준비하는 단계는, 과일 착즙액을 121℃의 온도로 15분간 고압습윤멸균한 후 부유물을 거름종이와 깔대기로 분리하고 당도를 적정량으로 맞춰 균 접종을 하는 것을 특징으로 한다.
- [0026] 또한, 본 발명에 따른 치과 의료용 바이오 셀룰로오스 차단막 제조 방법은, 상기 과일은, 배, 사과, 자두, 포도, 아오리 사과 등일 수 있으나 이에 제한되지 않는 것을 특징으로 한다.
- [0027] 또한, 본 발명에 따른 치과 의료용 바이오 셀룰로오스 차단막 제조 방법은, 상기 과일은 자연재해로 낙과된 미성숙, 성숙 배를 이용해도 유효한 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

- [0028] 상기와 같은 구성에 의하여 본 발명에 따른 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막 및 그 제조방법은 폐기되는 낙과의 재활용을 통한 과수농과의 경제성확보, 간단한 제조과정과 임상적인 조작으로 생물학적 안정성 및 가격 경쟁력을 확보할 수 있는 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막을 제공하여 치과 의료용 차단막의 국산화 및 수

입대체로 치과 의료비용 부담을 완화시킬 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0029] 도 1은 본 발명의 일실시예에 따른 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막 제조 방법의 흐름도이다.
- 도 2는 본 발명의 일실시예에 따른 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막 제조 방법으로 제조된 차단막 사진이다.
- 도3은 본 발명의 실험예에서 고체배지에서 배양된 초산균의 집락 사진이다.
- 도4는 본 발명의 실험예에서 제조된 액체 만니톨(Mannitol) 배양 배지 사진이다.
- 도5는 본 발명의 실험예에서 만니톨(Mannitol) 배양배지 내에 형성된 펠라클(Pellicle) 사진
- 도6은 본 발명의 실험예에서 만니톨(Mannitol) 배양배지 내에 형성된 멤브레인(membrane) 사진이다.
- 도7은 본 발명의 실험예에서 여과키트(Filtration Kit)를 이용한 셀룰로오스 멤브레인(cellulose membrane)의 성형 사진이다.
- 도8은 본 발명의 실험예에서 성형한 셀룰로오스 멤브레인(cellulose membrane)의 형상 사진이다.
- 도 9은 본 발명의 실험예에서 착즙액의 소재로 사용할 과일 선별하는 사진이다.
- 도 10는 본 발명의 실험예에서 5종 과일 착즙액의 색상을 나타내는 사진이다.
- 도 11는 본 발명의 실험예에서 거름종이와 깔대기를 이용한 배 착즙액의 부유물 분리하는 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0030] 이하에서는 도면에 도시된 실시예를 참조하여 본 발명에 따른 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막 및 그 제조 방법에 대해 상세하게 살펴보기로 한다.
- [0031] 도 1은 본 발명의 일실시예에 따른 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막 제조 방법의 흐름도이고, 도 2는 본 발명의 일실시예에 따른 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막 제조 방법으로 제조된 차단막 사진이다.
- [0032] 본 발명의 일실시예에 따른 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막은 당성분의 배지에 미생물 바이오셀룰로오스 합성균주인 초산균 *Gluconacetobacter xylinus*을 접종하여 현탁배양과 정치배양을 통해 생성된 바이오셀룰로오스 차단막을 소재로 제조된 것을 특징으로 한다.
- [0033] 한편, 도 1을 참조하면 상기와 같은 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막을 제조하는 방법은 당 배지를 준비하는 단계(S5), 바이오셀룰로오스막 생성 단계(S10)와, 멤브레인 획득 단계(S20)를 포함한다.
- [0034] 상기 당 배지를 준비하는 단계(S5)는 배양배지내 균 농도가 적정량이상이면 펠리클(pellicle)과 멤브레인(membrane) 형성이 거의 동일하게 형성되는 것을 이용하여 과일 등과 같은 식물소재를 기반으로 해 당성분의 배지를 만드는 단계이다.
- [0035] 본 발명에서 상기 당 배지를 준비하는 단계(S5)는 과일 착즙액을 121℃의 온도로 15분간 고압습윤멸균한 후 부유물을 거름종이와 깔대기로 분리하고 당도를 적정량으로 맞춰 균 접종을 하는 것을 특징으로 한다.
- [0036] 과일은 배, 사과, 자두, 아오리 사과,포도 등일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 이하에서 과일로 배를 예를 들어 설명한다.
- [0037] 이때의 당 배지는 자연 재해로 낙과된 미성숙, 성숙 배를 이용해도 유효한 것을 특징으로 한다.
- [0038] 상기 바이오셀룰로오스막 생성 단계(S10)는 당성분의 배지를 가압멸균한 후 초산균을 접종하여 일정기간 현탁배양하여 박막을 생성하고, 상기 박막을 일정기간 정치배양하여 상기 박막 주변에 소정의 두께를 갖는 바이오셀룰로오스막을 생성하는 단계이다.
- [0039] 본 발명의 일실시예에서 상기 바이오셀룰로오스막 생성 단계(S10)는 당성분의 배지를 121℃의 온도로 15분간 가압멸균한 후 미생물 바이오셀룰로오스 합성균주인 초산균 *Gluconacetobacter xylinus*을 접종하여 현탁배양기에 26℃의 온도로 3일간 현탁배양하여 박막을 생성하고, 상기 박막을 26℃의 온도에서 7일간 정치배양하여 상기 박막 주변에 소정의 두께를 갖는 바이오셀룰로오스막을 생성하는 것을 특징으로 한다.

- [0040] 한편, 본 발명의 일실시예에서 상기 당성분의 배지는 mannitol 배지(yeast 5g, peptone 3g, mannitol 25g, sterilized water final volume 1L)를 이용하였다.
- [0041] 상기 멤브레인 획득 단계(S20)는 상기 바이오셀룰로오스막에 부착된 미생물 및 불순물을 제거하고, 건조시켜 바이오셀룰로오스 멤브레인을 획득하는 단계이다.
- [0042] 본 발명의 일실시예에서 상기 멤브레인 획득 단계(S20)는 상기 바이오셀룰로오스막을 121℃의 온도로 15분간 가압멸균한 후 증류수에 7일간 침지시켜 복수회 세척하고, 100℃의 온도에서 30분간 0.1N 수산화나트륨(NaOH)에 반응시킨 후 pH7.0이 될 때까지 증류수에 침지시켜 복수회 세척하며, 흡착기로 수분을 제거한 뒤 건조장치로 드라이 오븐(dry oven)을 이용하여 50℃ 온도로 건조시켜 바이오셀룰로오스 멤브레인을 획득하는 것을 특징으로 한다.
- [0043] 상기 바이오셀룰로오스 멤브레인의 양쪽 표면이 음(-) 전하를 갖도록 상기 바이오셀룰로오스 멤브레인의 표면에 산소 플라즈마 처리를 할 수 있다. 구체적으로 상기 바이오셀룰로오스 멤브레인을 반응기에 투입하고, 상기 반응기 내에 산소를 주입하면서 상기 반응기 내부의 압력이 특정 압력, 예를 들어 200mTorr가 되도록 고정하며, 산소 플라즈마를 특정 시간, 예를 들어 3분간 발생시켜 상기 바이오셀룰로오스 멤브레인의 표면에 산소 플라즈마 처리를 할 수 있다.
- [0044] 도 2에는 상기와 같이 당 배지 준비단계(S5), 바이오셀룰로오스막 생성 단계(S10)와, 멤브레인 획득 단계(S20)를 거쳐 제조된 본 발명의 일실시예에 따른 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막 사진을 도시하였다.
- [0045] 아래의 표 1은 본 발명의 일실시예에 따른 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막의 인장강도를 측정한 결과이다.

표 1

멤브레인 크기(mm)	최대 하중(N)	인장강도 (Mpa)	탄성계수 (MPa)	인장변형률(%)
20×50	25	16.94±1.2	654.89±10	4.26±0.5

- [0046] 건조상태의 멤브레인(2cm×5cm)을 인장강도 분석기(Instron 5543)로 측정하여 인장강도를 분석하였다.
- [0047] 상기 표 2를 참조하면, 인장강도 측정 결과 본 발명의 일실시예에 따른 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막의 인장강도(Biocellulose membrane:16.9MPa)는 시중에 판매하는 차단막의 인장강도(Biogide:6.4MPa, Lysogide:6.3MPa)보다는 확연히 높다는 것을 확인할 수 있다.
- [0048] 상기와 같은 실험결과 본 발명에 따른 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막 즉, *Gluconacetobacter xylinus*로부터 합성된 미생물 바이오셀룰로오스를 기반으로 제조된 치과의료용 차단막은 치과의료용 차단막으로서 요구되는 우수한 생체적합성, 조직접합성, 외부세포차단능, 영양분의 전달력 및 장기간 공간확보능과 임상적 조작 용이성 등을 확보하고 있음을 확인되었다.
- [0049] 또한 미생물로부터 간단한 공정과정을 통한 경제적인 대량생산 가능성을 제시함에 따라 향후 치과의료용 비흡수성 차단막으로써 구강 내 임플란트 이식이 요구되는 환자들의 치과치료 비용을 완화시킬 수 있는 경제적인 구강 내 매식재료로써 활용이 가능할 것이다.
- [0050] 이하에서 본 발명의 실시예에 따른 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막 및 그 제조 방법의 실험예를 구체적으로 설명한다.
- [0051] **실험예**
- [0052] 1. 한천배지에서의 초산균 (*Gluconoacetobacter xylinus*) 배양을 통한 단일 집락 분리
- [0053] 500mL 용량의 용기에 이스트 추출물(Yeast extract) (212750, Bacto, USA) 1 g, 펩톤(Peptone)(211677, Bacto, USA) 6g, 만니톨(Mannitol)(21323, YAKURI, JPN) 5g, Bacto agar 6g을 넣고 3차 증류수를 첨가하여 최종 용량을 200mL로 조정(pH 6)했다.
- [0054] 다음으로 121℃에서 15분간 고압증멸균 처리했다. Petri Dish에 20mL 씩 분주하여 무균작업대 내에서 식혔다. 다음으로 한천배지위에 초산균을 spreading 하여 배양했다.
- [0055] 도3은 본 발명의 실험예에서 고체배지에서 배양된 초산균의 집락 사진을 도시하고 있다.

- [0057] 2. 초산균의 대량 배양을 위한 액체 만니톨(Mannitol) 배양 배지 제조
- [0058] 1L 용량의 용기에 이스트 추출물(Yeast extract) (212750, Bacto, USA) 5g, 펩톤(Peptide) (211677, Bacto, USA) 3g, 만니톨(Mannitol) (21323, YAKURI, JPN) 25 g을 넣고 3차 증류수를 첨가하여 최종 용량을 1L로 조정 (pH 6)했다. 다음으로 121℃에서 15분간 고압증멸균(Autoclave) 처리했다. 무균작업대 내에서 식힌 후, 250mL Bottle에 100mL 담아 121℃에서 15분간 다시 고압증멸균 처리했다. 고압증멸균 후, 배양배지가 들어있는 용기를 70% 에탄올로 소독하여 무균작업대에서 식힌 다음 사용했다.
- [0059] 도4는 본 발명의 실험예에서 제조된 액체 만니톨(Mannitol) 배양 배지 사진이다.
- [0060] 3. 액체 만니톨(Mannitol) 배양 배지(액체배지)에서의 초산균 배양을 통한 셀룰로오스 pellicle 생성 유도
- [0061] 상기(2)의 과정에서 제조한 액체 배지에 한천 배지상의 단일 집락을 취하여 액체배지에 넣은후, 72시간 동안 26 ℃, 100 rpm의 호기성 조건에서 진탕배양했다. 초산균에 산소를 공급하기 위하여 용기의 뚜껑은 느슨하게 풀어두고, 뚜껑이 열리는 것을 방지하기 위하여 용기와 뚜껑을 함께 테이핑했다. 만니톨(Mannitol) 배양배지 내의 펠리클(Pellicle) 형성을 확인 후, 7일간 26 ℃의 호기성조건에서 정치배양했다.
- [0062] 도5는 본 발명의 실험예에서 만니톨(Mannitol) 배양배지 내에 형성된 펠라클(Pellicle) 사진이다.
- [0063] 4. 액체배지의 pH 조건에 따른 초산균의 성장 및 펠리클(pellicle), 셀룰로오스 멤브레인(cellulose membrane)의 생성 비교 분석
- [0064] pH 변화에 따라 초산균의 성장에 대한 적정 pH를 확인하기 위하여 실험을 진행하였다. pH가 각각 다른 5종류의 만니톨(Mannitol) 배양배지(pH 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0) 제조한뒤 72시간 동안 26 ℃, 100 rpm의 호기성 조건에서 진탕배양했다. 진탕배양 이후, 7일간 26 ℃의 호기성조건에서 정치배양했다. 그 결과 배양중인 용기 안에 셀룰로오스 멤브레인(cellulose membrane)이 형성된 것을 확인했다. 0.1 N NaOH, DW 수세 과정을 거친 후 셀룰로오스 멤브레인(cellulose membrane)을 성형 전과 건조 후의 무게를 각각 측정했다.
- [0065] [표 2]은 pH가 각각 액체배지에서 생성된 cellulose membrane과 pellicle의 중량을 나타낸다.

표 2

[0066]

pH		Tissue (weight, g)	Filtration (weight, g)	Dry (weight, g)
3.5	Membrane	5.429	1.528	0.052
	Pellicle	0.379	0.036	-
4.0	Membrane	8.060	3.631	0.088
	Pellicle	5.015	0.275	0.009
4.5	Membrane	9.204	3.994	0.092
	Pellicle	4.077	0.315	0.009
5.0	Membrane	11.882	5.932	0.137
	Pellicle	1.056	0.045	0.002

[0067] pH 3을 제외한 모든 Mannitol 배양 배지에서 펠리클(pellicle)과 멤브레인(membrane)이 형성되었다. 전체적인 결과를 확인하면 낮은 pH에서 형성된 펠리클(pellicle)과 멤브레인(membrane)의 무게가 훨씬 더 가볍고, 장력 또한 얇았다. 그러므로 초산균 배양의 적정 pH 값은 중성에 가까운 pH5에서부터 7정도까지의 수준으로 확인하였다.

[0068] 5. 액체배지의 당도 조건에 따른 초산균의 성장 및 펠리클(pellicle), 셀룰로오스 멤브레인(cellulose membrane)의 생성 비교 분석

[0069] 당도(Brix) 변화에 따른 초산균의 성장에서 적정 Brix를 확인하기 위하여 실험을 진행하였다. 당도(Brix)가 각각 다른 4종류의 만니톨(Mannitol) 배양배지(° Bx 5, 6, 7, 8) 제조했다. 다음으로 72시간 동안 26 ℃, 100 rpm의 호기성 조건에서 진탕배양했다. 진탕배양 이후, 7일간 26 ℃의 호기성조건에서 정치배양했다. 그 결과 배양중인 용기 안에 셀룰로오스 멤브레인(cellulose membrane)이 형성된 것을 확인했다. 0.1 N NaOH, DW 수세 과정을 거친 후 cellulose membrane을 성형 전과 건조 후의 무게를 각각 측정했다.

[0070] [표 3]은 각기 다른 당도의 액체배지에서 생성된 셀룰로오스 멤브레인(cellulose membrane)과 펠리클(pellicl

e)의 중량을 나타낸다.

표 3

Brix		Tissue (weight, g)	Filtration (weight, g)	Dry (weight, g)
5	Membrane	11.29	7.129	0.172
	Pellicle	2.860	0.192	0.007
6	Membrane	12.561	6.528	0.172
	Pellicle	2.779	0.064	0.006
7	Membrane	12.641	6.797	0.174
	Pellicle	2.630	0.053	0.005
8	Membrane	10.709	5.130	1.1
	Pellicle	3.710	0.102	0.008

각각 다른 당도(Brix)에서 초산균을 배양한 결과 당도가 높아질수록 초산균의 펠리클(pellicle)과 멤브레인(membrane)의 형성에 대한 차이는 눈에 띄게 확인되지 않았다. 그러므로 불필요하게 당도 (Brix)를 높이지 않아도 될 것으로 판단된다. 만니톨(Mannitol) 배양배지의 본 당도(Brix)인 4 Brix로 맞추기로 결정하였다.

6. 액체 만니톨(Mannitol) 배양 배지에서 펠리클(pellicle)로부터 셀룰로오스 멤브레인(cellulose membrane) 생성 및 성형을 위한 전단계 조건 확립

배양중인 용기 안에 두께 약 3mm의 셀룰로오스 막이 형성된 것을 확인했다. 0.1 N NaOH 제조 방법: NaOH 4 g을 넣고, 증류수로 총 용량을 1 L로 조정했다. 무균작업대에서 화염 멸균된 핀셋으로 셀룰로오스 멤브레인(cellulose membrane)을 건어내어 0.1 N NaOH 용액에 넣고 90 - 100 °C에서 셀룰로오스 멤브레인(cellulose membrane)의 색이 제거될 때까지 중탕했다. 셀룰로오스 멤브레인(cellulose membrane)의 pH를 중성으로 맞추기 위해, 3차 멸균수를 넣고, 교반 반복했다. pH meter를 이용하여 중성의 pH 확인한뒤 셀룰로오스 멤브레인(cellulose membrane)을 121°C에서 15분간 고압증압멸균 처리했다. 셀룰로오스 멤브레인(cellulose membrane)을 식힌 후, 성형, 건조 준비를 했다.

도6은 본 발명의 실험예에서 만니톨(Mannitol) 배양배지 내에 형성된 멤브레인(membrane) 사진이다.

7. 회수된 셀룰로오스 멤브레인(cellulose membrane)의 성형, 건조 조건 확립

여과 키트(Filtration Kit) 위에 여과지(Filter Paper)를 올리고, 식은 셀룰로오스 멤브레인(cellulose membrane)을 올린다. 도7은 본 발명의 실험예에서 여과키트(Filtration Kit)를 이용한 셀룰로오스 멤브레인(cellulose membrane)의 성형 사진이다.

그 다음에 그 위에 다른 한 장의 여과지(Filter Paper)를 올린다. 그리고 균일하게 셀룰로오스 멤브레인(cellulose membrane)을 퍼주면서 진공펌프를 이용하여 수분 제거한다. 어느 정도 수분이 제거되면 윗부분의 여과지(Filter Paper)를 제거하고 55 °C의 건조기에서 건조시킨다. 건조가 완료되면 여과지(Filter Paper)와 셀룰로오스 멤브레인(cellulose membrane)을 분리하여 셀룰로오스 멤브레인(cellulose membrane)을 보관했다.

도8은 본 발명의 실험예에서 성형한 셀룰로오스 멤브레인(cellulose membrane)의 형상 사진이다.

8. 초산균 배양용 과일 배지 조성을 위한 과일 소재 선별

사과, 감, 배, 자두, 포도, 참외 등의 다양한 과일을 선택한뒤 각각의 과육을 착즙했다. 도 9은 본 발명의 실험예에서 착즙액의 소재로 사용할 과일 선별하는 사진이다.

배양배지의 색에 따라 셀룰로오스 멤브레인(cellulose membrane)의 색이 결정되고, 탈색하는 과정이 길어지기 때문에 과일의 색이 거의 없는 것으로 선택하는것이 좋다. 착즙물이 가장 좋고, 갈변현상이 거의 없는 배로 선택했다.

9. 초산균 배양용 과일 배지 조성을 위한 과일 착즙액의 이화학적 특성 확인

배, 사과, 자두, 아오리사과를 착즙했다. 도 10는 본 발명의 실험예에서 5종 과일 착즙액의 색상을 나타내는 사진이다. 착즙액의 종류별로 pH, Brix 측정했다.

[0085] [표4]는 과일 착즙액의 pH와 당도를 분석한 표이다.

표 4

[0086]

	배	사과	자두	사과(아오리)	포도
pH	4.5 ± 0.1	4.4 ± 0.05	3.4 ± 0.05	3.84	3.8 ± 0.02
Brix	10.5 ± 1.6	12.1 ± 0.1	13.8 ± 0.1	12.3 ± 0.3	15.6

[0087] 사과와 배의 착즙액을 제외한 나머지 과일 착즙액 (자두, 포도)은 진한색을 나타내므로 펠라클(pellicle) 형성, 셀룰로오스 멤브레인(cellulose membrane)형성 확인이 어렵고, 완성된 셀룰로오스 멤브레인(cellulose membrane)의 탈색과정에서도 시간이 많이 필요하므로 과일 배지로 사용이 어렵다. 사과 또한 갈변현상이 심하여 오래 보관하는것은 어려우므로 가장 적합한 과일소재로 배의 착즙액을 선택하였다.

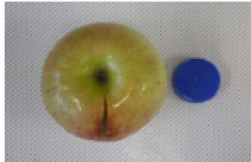
[0088] 10. 완숙 사과와 미성숙 사과로부터 착즙한 과일 배지 특성 분석

[0089] 완숙 사과, 미성숙 사과를 착즙하여 pH, Brix 확인했다.

[0090] [표5]는 사과의 성숙도에 따른 pH와 당도 분석한 표이다.

표 5

[0091]

	완숙 사과	미성숙 사과
		
pH	3.7 ± 0.1	3.6 ± 0.06
Brix	12.5 ± 0.9	10.8 ± 0.4

[0092] 과일의 완숙도에 따라 pH와 Brix의 약간의 차이는 보이지만 큰 차이는 없는 것으로 판단되고 자연재해로 낙과된 미성숙, 성숙 사과를 유효한 셀룰로오스 생성 소재로 사용가능함을 알 수 있었다.

[0093] 11. 3종의 과일(배, 사과, 감) 착즙액 함유 배지에서의 초산균 배양을 통한 펠라클(pellicle), 셀룰로오스 멤브레인(cellulose membrane)의 생성 비교 분석

[0094] 과일 배지에 접종되는 적정 균의 농도를 확인하기 위하여 실험을 진행하였다.

[0095] 과일 배지 제조한 뒤 만니톨(Mannitol) 배양배지에서 배양중인 배양액을 수거하여 과일 배지에 접종했다. 26 ℃, 100 rpm의 호기성 조건에서 진탕배양했다. 감과 배의 착즙액 함유 배지는 3일 배양, 사과 착즙액 함유 배지는 4일 배양했다. 진탕배양 이후, 26 ℃의 호기성조건에서 정치배양했다. 감 착즙액 함유 배지는 9일 배양, 배와 사과 착즙액 함유 배지는 8일 배양했다. 배양중인 용기 안에 셀룰로오스 멤브레인(cellulose membrane)이 형성된 것을 확인했다.

[0096] 0.1 N NaOH, DW 수세 과정을 거친 후 셀룰로오스 멤브레인(cellulose membrane)을 성형 전과 건조 후의 무게를 각각 측정했다.

[0097] [표6]은 50.00~6.25%의 균 농도에서 생성된 cellulose membrane의 수분 중량, 건조중량의 비교분석 1을 나타낸다.

표 6

균 농도(%)	50	25
배		
수분 중량(g)	3.65	3.67
건조 중량(g)	0.025	0.033
균 농도(%)	12.5	6.25
배		
수분 중량(g)	5.75	4.42
건조 중량(g)	0.048	0.047

[0098]

[0099] [표7] 은 50.00~6.25%의 균 농도에서 생성된 cellulose membrane의 수분 중량, 건조중량의 비교분석 2차를 나타낸다.

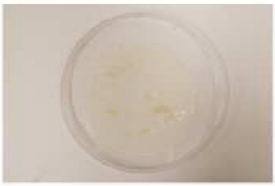
표 7

균 농도(%)	50	25
사과		
수분 중량(g)	0.955	0.895
건조 중량(g)	0.033	0.019
균 농도(%)	12.5	6.25
사과		
수분 중량(g)	1.183	1.017
건조 중량(g)	0.022	0.011

[0100]

[0101] [표8]은 50.00~6.25%의 균 농도에서 생성된 cellulose membrane의 수분 중량, 건조중량의 비교분석 3차를 나타낸다.

표 8

균 농도(%)	50	25
균		
수분중량(g)	1.336	1.067
건조중량(g)	0.014	0.018
균 농도(%)	12.5	6.25
균		
수분중량(g)	1.038	2.2
건조중량(g)	0.012	0.013

[0102]

[0103] 배양 배지 내의 균 농도가 적정 농도 이상이 되면 pellicle과 membrane의 형성은 거의 동일하다고 판단된다. 그러므로 과일 배지 내에 균을 접종할 경우에는 배양액의 약 7%의 용량을 접종하여 배양하기로 결정하였다.

[0104] 12. 완숙 배와 미성숙 배로부터 추출한 착즙액의 과일 배지 특성 분석

[0105] 완숙 배, 미성숙 배를 착즙하여 pH, Brix를 확인했다.

[0106] [표9]는 배의 성숙도에 따른 pH와 당도 분석을 나타낸다.

표 9

	완숙 배	미성숙 배
		
pH	4.6±0.02	4.6 ±0.03
Brix	13	10.7 ±0.12

[0107]

[0108] 과일의 완숙도에 따라 pH와 당도(Brix)의 약간의 차이는 보이지만 큰 차이는 없는 것으로 판단되어 자연채해로 낙과된 미성숙, 성숙 배를 유효한 셀룰로오스 생성 소재로 사용가능함을 알 수 있었다.

[0109] 13. 배의 착즙액이 함유된 초산균 배지 제조조건의 확립

[0110] 4 Brix의 배 착즙액을 100 mL이 들어있는 250 mL Bottle 안에 균 접종했다. 휴롬 (Hurom), HN-NBK20 제품을 구입하여 착즙했다.(착즙률 최대1 kg당 500 mL) 착즙액을 비커에 담아 121℃에서 15분간 고압습윤멸균 처리했다. 고압습윤멸균 후, 비커 위에 떠오른 부유물을 거름종이와 깔대기를 이용하여 분리했다.

[0111] 도 11는 본 발명의 실험예에서 거름종이와 깔대기를 이용한 배 착즙액의 부유물 분리하는 사진이다.

[0112] 당도계로 당도를 측정하여, 4 Brix에 맞춰지도록 증류수 첨가했다. 15 Brix의 배 착즙액에 증류수를 첨가하여 4 Brix 만들었다. (15 Brix 배 착즙액(26)에 증류수(74)를 혼합 후, 다시 Brix를 측정했다.) 이때 당도 (Brix)가 높다면 증류수를 첨가하고, 당도(Brix)가 낮다면 배 착즙액을 첨가한다. 4 Brix의 착즙액을 250 mL Bottle 안에

100 mL 첨가 후, 121 °C에서 15분간 고압습윤멸균 처리했다. 다음으로 무균작업대에서 식힌 후, 균 접종을 했다.

[0113] 14. 제조된 배 착즙액 함유 배지에서 초산균 배양조건에서 초기 균의 농도 및 바이오셀룰로오스 생성조건 확립 (1단계)

[0114] 과일 배지에 접종되는 적정 균의 농도를 확인하기 위하여 실험을 진행하였다. OD₆₀₀에서의 흡광도 값이 1일 때 균 수는 0.8×10^9 이다. HS 고체 배지에 초산균을 spreading했다. HS 고체 배지에 초산균이 자라면 spreading시 사용하는 유리 도구 사용하여 균을 긁어 모아 원심분리 (1,000rpm / 3분)한다. 모아진 알갱이(pellet)는 남겨두고 상등액만 제거한다. 알갱이(pellet)에 배지를 첨가하여 회석 후, 흡광도 측정했다. 그리고 균수를 계산하여 착즙 배 배지에 접종했다. 이후 과정은 동일하다.

[0115] [표10]은 초산균의 접종 농도에 따른 배양 시간을 나타낸다.

표 10

	초산균의 농도		
	5×10^5	5×10^6	5×10^7
현탁배양	pellicle 형성 안됨	pellicle 형성(10일)	pellicle 형성(5일)
정지배양	pellicle 형성 안됨	membrane 형성 안됨	membrane 형성(9일)

[0117] 균의 수가 적은 것으로 판단되어 균의 수를 늘려서 접종하기로 결정하였다.

[0118] 15. 제조된 배 착즙액 배지에서 초산균 배양조건에서 초기 균의 농도 및 바이오셀룰로오스 생성조건 확립 (2 단계)

[0119] 과일 배지에 접종되는 적정 균의 농도를 확인하기 위하여 실험을 진행하였다. OD₆₀₀에서의 흡광도 값이 1일 때 균 수는 0.8×10^9 이다. HS 고체 배지에 초산균을 spreading했다. HS 고체 배지에 초산균이 자라면 spreading시 사용하는 유리 도구 사용하여 균을 긁어 모아 원심분리 (1,000rpm / 3분)한다. 모아진 알갱이(pellet)는 남겨두고 상등액만 제거한다. 알갱이(pellet)에 배지를 첨가하여 회석 후, 흡광도 측정했다. 그리고 균수를 계산하여 착즙 배 배지에 접종했다. 이후 과정은 동일하다.

[0120] [표11] 은 초산균의 접종 농도에 따른 배양 시간을 나타낸다.

표 11

	10×10^5	10×10^6	10×10^7
현탁배양	pellicle 형성 안됨	6일	4일
정지배양		membrane 형성 안됨	7일

[0122] 더 많은 균의 접종으로 이전의 농도에서보다는 조금 더 빠르게 셀룰로오스 멤브레인(cellulose membrane)을 합성하지만 일반 만니톨(Mannitol) 배지에서와 비교시 조금 느리다고 판단되어, 다시 균수를 증가시켜 접종하기로 하였다.

[0123] 16. 제조된 배 착즙액 배지에서 초산균 배양조건에서 초기 균의 농도 및 바이오셀룰로오스 생성조건 확립 (최종 단계)

[0124] 과일 배지에 접종되는 적정 균의 농도를 확인하기 위하여 실험을 진행하였다. OD₆₀₀에서의 흡광도 값이 1일 때 균 수는 0.8×10^9 이다. HS 고체 배지에 초산균을 spreading했다. HS 고체 배지에 초산균이 자라면 spreading시 사용하는 유리 도구 사용하여 균을 긁어 모아 원심분리 (1,000rpm / 3분)한다. 모아진 알갱이(pellet)는 남겨두고 상등액만 제거한다. 알갱이(pellet)에 배지를 첨가하여 회석 후, 흡광도 측정했다. 그리고 균수를 계산

하여 착즙 배 배지에 접종했다. 이후 과정은 동일하다.

[표12]는 초산균의 접종 농도에 따른 배양 시간을 나타낸다.

표 12

	125×10^6	250×10^6	500×10^6
현탁배양	2일	2일	2일
정지배양	7일	7일	7일

일반 만니톨(Mannitol) 배지에서와 비슷하게 펠리클(pellicle)을 형성하고 셀룰로오스 멤브레인(cellulose membrane)을 형성하므로 배 배지에 접종하는 적정 균수를 확립하였다.

표13은 초산균의 접종 농도에 따라 형성되는 펠리클(pellicle)을 나타낸다.

표 13

				
trol	con	125×10^6	250×10^6	500×10^6

진술한 바와 같이, 본 발명에 따른 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막 및 그 제조방법은 폐기되는 낙과의 재활용을 통한 과수농가의 경제성확보, 간단한 제조과정과 임상적인 조작으로 생물학적 안정성 및 가격 경쟁력을 확보할 수 있는 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막을 제공하여 치과 의료용 차단막의 국산화 및 수입대체로 치과 의료비용 부담을 완화시킬 수 있는 효과가 있다.

앞에서 설명되고, 도면에 도시된 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막 및 그 제조 방법은 본 발명을 실시하기 위한 하나의 실시예에 불과하며, 본 발명의 기술적 사상을 한정하는 것으로 해석되어서는 안된다. 본 발명의 보호범위는 이하의 특허청구범위에 기재된 사항에 의해서만 정하여지며, 본 발명의 요지를 벗어남이 없이 개량 및 변경된 실시예는 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명한 것인 한 본 발명의 보호 범위에 속한다고 할 것이다.

부호의 설명

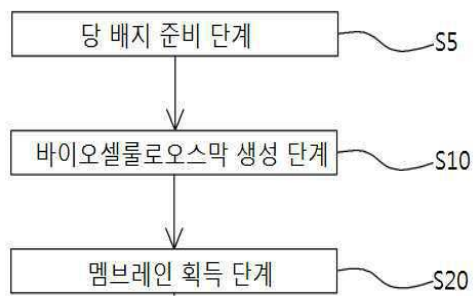
S5 당성분 배지 준비 단계

S10 바이오셀룰로오스막 생성 단계

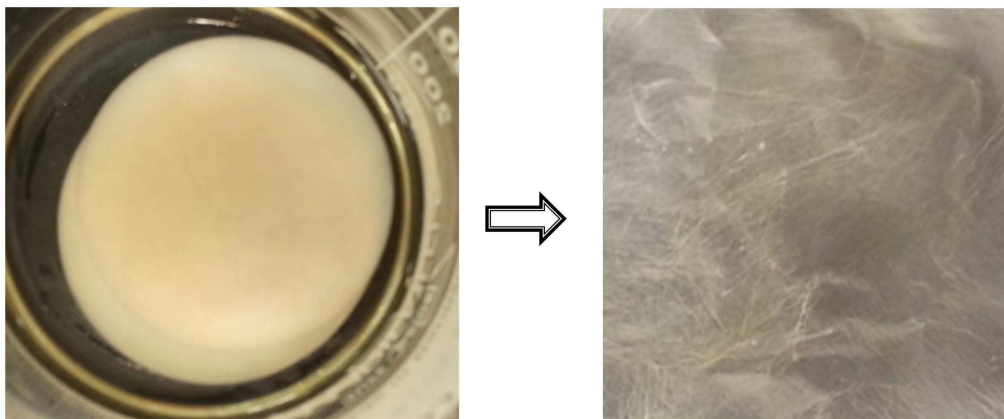
S20 멤브레인 획득 단계

도면

도면1



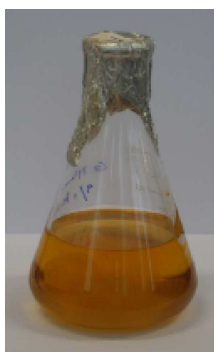
도면2



도면3



도면4



도면5



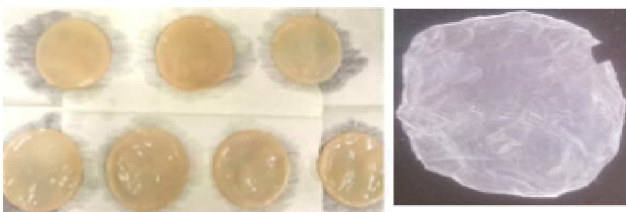
도면6



도면7



도면8



도면9



도면10

배	사과	자두	아오리 사과
 포도			

도면11

