



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호

10-2016-0061171

(43) 공개일자

2016년05월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61C 8/00 (2006.01) A61C 13/107 (2006.01)

A61C 5/00 (2006.01) A61L 27/20 (2006.01)

(21) 출원번호

10-2014-0163736

(22) 출원일자

2014년11월21일

심사청구일자

2014년11월21일

(71) 출원인

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)

(72) 발명자

김수관

광주광역시 서구 풍암중앙로 68, 104동 503호 (풍암동, 금호타운풍암1차아파트)

이숙영

광주광역시 남구 봉선중앙로 46, 108동 201호 (봉선동, 삼익1차아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인아이엠

전체 청구항 수 : 총 6 항

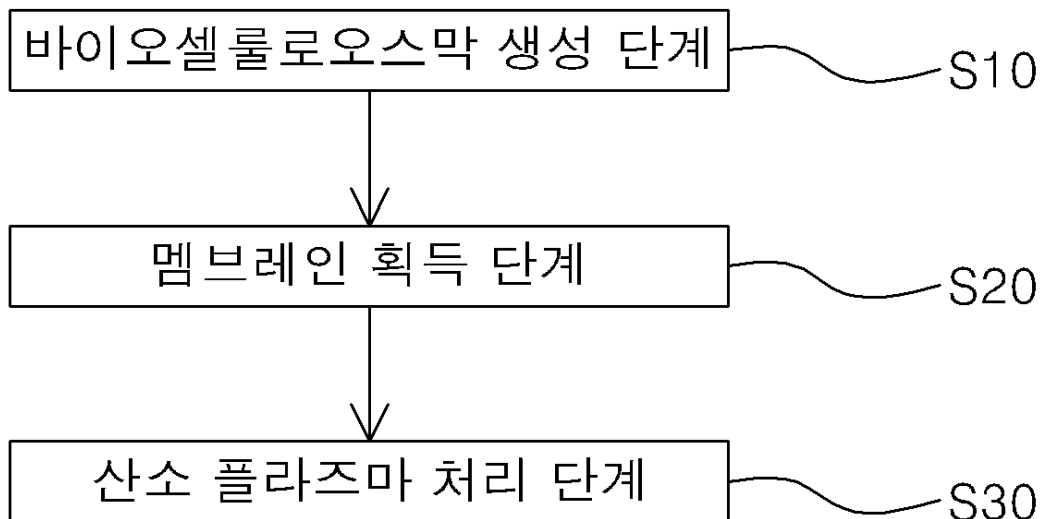
(54) 발명의 명칭 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막 및 그 제조 방법

(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 산

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



업의 신소재로 각광받고 있는 미생물 바이오셀룰로오스(Microbial cellulose)를 기반으로 한 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막 및 그 제조 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막은, 당성분의 배지에 미생물 바이오셀룰로오스 합성균주인 초산균 *Gluconacetobacter xylinus*을 접종하여 현탁배양과 정지배양을 통해 생성된 바이오셀룰로오스 차단막을 소재로 제조된 바이오셀룰로오스 멤브레인의 양쪽 표면이 음(-) 전하를 갖도록 산소 플라즈마 처리된 것을 특징으로 한다.

(72) 발명자

김재성

광주광역시 북구 일곡로 80, 102동 1401호 (일곡동, 일곡1차청솔아파트)

오다혜

광주광역시 광산구 첨단중앙로181번길 88-21, 103동 1102호 (월계동, 대우아파트)

강정록

부산광역시 해운대구 해운대로 361, 101동 801호 (우동, 센텀삼환아파트)

박정강

광주광역시 동구 필문대로287번길 9, 204호 (지산동, 상록수원룸)

오지수

광주광역시 동구 운림길 27, 101동 202호 (운림동)

명세서

청구범위

청구항 1

당성분의 배지에 미생물 바이오셀룰로오스 합성균주인 초산균 *Gluconacetobacter xylinus*을 접종하여 현탁배양과 정치배양을 통해 생성된 바이오셀룰로오스 차단막을 소재로 제조된 멤브레인의 양쪽 표면이 음(-) 전하를 갖도록 산소 플라즈마 처리된 것을 특징으로 하는 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막.

청구항 2

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 단계와;

상기 바이오셀룰로오스 멤브레인의 양쪽 표면이 음(-) 전하를 갖도록 상기 바이오셀룰로오스 멤브레인의 표면에 산소 플라즈마 처리를 하는 산소 플라즈마 처리 단계를; 포함하는 것을 특징으로 하는 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막 제조 방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 바이오셀룰로오스막 생성 단계는, 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 하는 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막 제조 방법.

청구항 4

제2항 또는 제3항에 있어서,

상기 멤브레인 획득 단계는, 상기 바이오셀룰로오스막을 가압멸균한 후 증류수에 침지시켜 복수회 세척하고, 수산화나트륨(NaOH)에 반응시킨 후 pH7.0이 될 때까지 증류수에 침지시켜 복수회 세척하며, 흡착기 및 건조장치를 이용하여 건조시켜 바이오셀룰로오스 멤브레인을 획득하는 것을 특징으로 하는 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막 제조 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 멤브레인 획득 단계는, 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 하는 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막 제조 방법.

청구항 6

제2항 또는 제3항에 있어서,

상기 산소 플라즈마 처리 단계는, 상기 바이오셀룰로오스 멤브레인을 반응기에 투입하고, 상기 반응기 내에 산소를 주입하면서 상기 반응기 내부의 압력이 200mTorr가 되도록 고정하며, 산소 플라즈마를 1분간 발생시켜 상기 바이오셀룰로오스 멤브레인의 표면에 산소 플라즈마 처리를 하는 것을 특징으로 하는 치과 의료용 바이오셀

룰로오스 차단막 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 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 확보하며, 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.

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 차단막(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 시술로서 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 제조과정 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 "실크단백질을 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, 등록특허

공보 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 주재로 하는 생분해성 및 무독성 필름타입의 의료용 드레싱 제제"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(공고일자: 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 제제, 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 실크단백질 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.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0021] 본 발명은 다양한 특성을 지닌 바이오셀룰로오스를 치과 의료용 차단막으로 사용하기 위하여 안출된 것으로, 본 발명의 목적은 효과적인 잇몸뼈 생성을 위한 공간 확보와 외부세포 차단, 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

[0022] 본 발명에 따른 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막은, 당성분의 배지에 미생물 바이오셀룰로오스 합성균주인 초산균 *Gluconacetobacter xylinus*를 접종하여 현탁배양과 정치배양을 통해 생성된 바이오셀룰로오스 차단막을 소재로 제조된 바이오셀룰로오스 멤브레인의 양쪽 표면이 음(-) 전하를 갖도록 산소 플라즈마 처리된 것을 특징으로 한다.

[0023] 또한, 본 발명에 따른 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막 제조 방법은, 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 단계와; 상기 바이오셀룰로오스 멤브레인의 양쪽 표면이 음(-) 전하를 갖도록 상기 바이오셀룰로오스 멤브레인의 표

면에 산소 플라즈마 처리를 하는 산소 플라즈마 처리 단계들; 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0024] 또한, 본 발명에 따른 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막 제조 방법은, 상기 바이오셀룰로오스막 생성 단계는, 당성분의 배지를 121℃의 온도로 15분간 가압멸균한 후 미생물 바이오셀룰로오스 합성균주인 초산균 *Gluconacetobacter xylinus*를 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.

[0025] 또한, 본 발명에 따른 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막 제조 방법은, 상기 멤브레인 획득 단계는, 상기 바이오셀룰로오스막을 가압멸균한 후 증류수에 침지시켜 복수회 세척하고, 수산화나트륨(NaOH)에 반응시킨 후 pH7.0이 될 때까지 증류수에 침지시켜 복수회 세척하며, 흡착기 및 건조장치를 이용하여 건조시켜 바이오셀룰로오스를 소재로 한 바이오셀룰로오스 멤브레인을 획득하는 것을 특징으로 한다.

[0026] 또한, 본 발명에 따른 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막 제조 방법은, 상기 멤브레인 획득 단계는, 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.

[0027] 또한, 본 발명에 따른 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막 제조 방법은, 상기 산소 플라즈마 처리 단계는, 상기 바이오셀룰로오스 멤브레인을 반응기에 투입하고, 상기 반응기 내에 산소를 주입하면서 상기 반응기 내부의 압력이 200mTorr가 되도록 고정하며, 산소 플라즈마를 1분간 발생시켜 상기 바이오셀룰로오스 멤브레인의 표면에 산소 플라즈마 처리를 하는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0028] 상기와 같은 구성에 의하여 본 발명에 따른 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막은 차단막의 소재로 바이오셀룰로오스를 채택함으로써 적당한 인장강도와 높은 수분 보유능, 습윤성, 생체적합성, 무독성, 주변 조직의 침투와 세균 침입 차단, 임상적 조작 수월, 경제적인 비용 등의 장점을 갖는 안정성이 확보된 골유도 재생술을 위한 치과 의료용 차단막 제공이라는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 본 발명의 일실시예에 따른 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막 제조 방법의 흐름도
 도 2는 본 발명의 일실시예에 따른 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막 제조 방법으로 제조된 차단막 사진
 도 3은 주사전자현미경(SEM)을 이용하여 촬영된 본 발명의 일실시예에 따른 바이오셀룰로오스 멤브레인의 표면 사진
 도 4는 본 발명의 일실시예에 따른 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막의 세포독성 유무를 분석한 그래프
 도 5는 본 발명의 일실시예에 따른 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막의 세포부착능 분석 사진
 도 6은 본 발명의 일실시예에 따른 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막의 수분흡수도를 측정한 그래프
 도 7은 동물실험을 통한 본 발명의 일실시예에 따른 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막의 골 전도성 분석을 위한 촬영 사진
 도 8은 본 발명의 일실시예에 따른 8주간 탈회법을 진행한 차단막에 대한 Hematoxylin & Eosin staining 조직학적 염색법 결과 사진
 도 9는 본 발명의 일실시예에 따른 8주간 탈회법을 진행한 차단막에 대한 Safranin O and Fast green staining 조직학적 염색법 결과 사진

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 사진이며, 도 3은 주사전자현미경(SEM)을 이용하여 촬영된 본 발명의 일실시예에 따른 바이오셀룰로오스 멤브레인의 표면 사진이고, 도 4는 본 발명의 일실시예에 따른 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막의 세포독성 유무를 분석한 그래프이며, 도 5는 본 발명의 일실시예에 따른 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막의 세포부착능 분석 사진이고, 도 6은 본 발명의 일실시예에 따른 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막의 수분흡수도를 측정한 그래프이며, 도 7은 동물실험을 통한 본 발명의 일실시예에 따른 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막의 골 전도성 분석을 위한 촬영 사진이고, 도 8은 본 발명의 일실시예에 따른 8주 차단막에 대한 Hematoxylin & Eosin staining 조직학적 염색법 결과 사진이며, 도 9는 본 발명의 일실시예에 따른 8주 차단막에 대한 Safranin O and Fast green staining 조직학적 염색법 결과 사진이다.

- [0032] 본 발명의 일실시예에 따른 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막은 당성분의 배지에 미생물 바이오셀룰로오스 합성균주인 초산균 *Gluconacetobacter xylinus*를 접종하여 현탁배양과 정치배양을 통해 생성된 바이오셀룰로오스 차단막을 소재로 제조된 바이오셀룰로오스 멤브레인의 양쪽 표면이 음(-) 전하를 갖도록 산소 플라즈마 처리된 것을 특징으로 한다.
- [0033] 한편, 도 1을 참조하면 상기와 같은 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막을 제조하는 방법은 바이오셀룰로오스막 생성 단계(S10)와, 멤브레인 획득 단계(S20)와, 산소 플라즈마 처리 단계(S30)를 포함한다.
- [0034] 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.
- [0035] 본 발명의 일실시예에서 상기 바이오셀룰로오스막 생성 단계(S10)는 당성분의 배지를 121℃의 온도로 15분간 가압멸균한 후 미생물 바이오셀룰로오스 합성균주인 초산균 *Gluconacetobacter xylinus*를 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.
- [0036] 한편, 본 발명의 일실시예에서 상기 당성분의 배지는 mannitol 배지(yeast 5g, peptone 3g, mannitol 25g, sterilized water final volume 1L)를 이용하였다.
- [0037] 상기 멤브레인 획득 단계(S20)는 상기 바이오셀룰로오스막에 부착된 미생물 및 불순물을 제거하고, 건조시켜 바이오셀룰로오스 멤브레인을 획득하는 단계이다.
- [0038] 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.
- [0039] 상기 산소 플라즈마 처리 단계(S30)는 상기 바이오셀룰로오스 멤브레인의 양쪽 표면이 음(-) 전하를 갖도록 상기 바이오셀룰로오스 멤브레인의 표면에 산소 플라즈마 처리를 하는 단계이다.
- [0040] 본 발명의 일실시예에서 상기 산소 플라즈마 처리 단계(S30)는 상기 바이오셀룰로오스 멤브레인을 반응기에 투입하고, 상기 반응기 내에 산소를 주입하면서 상기 반응기 내부의 압력이 200mTorr가 되도록 고정하며, 산소 플라즈마를 1분간 발생시켜 상기 바이오셀룰로오스 멤브레인의 표면에 산소 플라즈마 처리를 하는 것을 특징으로 한다.
- [0041] 도 2에는 상기와 같이 바이오셀룰로오스막 생성 단계(S10)와, 멤브레인 획득 단계(S20)와, 산소 플라즈마 처리 단계(S30)를 거쳐 제조된 본 발명의 일실시예에 따른 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막 사진을 도시하였다.
- [0042] 한편, 도 3에는 주사전자현미경(SEM)을 이용하여 촬영된 바이오셀룰로오스 멤브레인의 표면을 도시하였는데, 산소플라즈마 처리를 하지 않은 멤브레인(위 사진)과, 산소플라즈마 처리를 한 멤브레인(아래 사진)을 백금코팅 처리 후 전자현미경으로 표면구조를 관찰하였다.
- [0043] 플라즈마를 처리하지 않은 멤브레인은 플라즈마 처리를 한 멤브레인 보다 분해능이 높아서 15.0 kV 가속전압에서 촬영하고, 플라즈마 처리를 한 멤브레인은 25.0 kV 가속전압에서 촬영하여 표면구조를 관찰하였다.
- [0044] 도 3를 살펴보면, 플라즈마 처리를 하지 않은 멤브레인의 나노섬유는 최소 12.5nm에서 최대 78.3nm의 직경을 띠

고, 플라즈마 처리한 멤브레인의 나노섬유는 최소 5.95nm에서 최대 71.3nm의 직경을 띠었다.

[0045] 바이오셀룰로오스 멤브레인의 표면구조를 비교해 보았을 때 플라즈마를 처리한 멤브레인은 플라즈마 처리를 하지 않은 멤브레인 보다 더 높은 분해능과 더 높은 다공성을 띠어 경량, 단열과 흡음 등의 효과가 더 높음을 예상할 수 있다.

[0046] 한편, 아래의 표 1은 본 발명의 일실시예에 따른 바이오셀룰로오스 멤브레인의 직경을 측정한 결과이다.

표 1

	샘플1	샘플2	샘플3	샘플4	샘플5	평균
건조상태 직경(mm)	0.02	0.03	0.03	0.04	0.06	0.36±0.015
침지후 직경(mm)	0.04	0.04	0.05	0.06	0.09	0.56±0.020

[0048] 상기 표 1의 값은 디지털 캘리퍼(Digital caliper)를 사용하여 건조상태 멤브레인과, 1시간 동안 인산 완충 식염수(PBS)에 침지 후의 멤브레인의 두께를 측정한 것이다.

[0049] 각각 5개의 바이오셀룰로오스 멤브레인의 두께를 측정하여 평균값을 구한 결과, 건조된 멤브레인의 두께는 36(± 0.015)μm, PBS 침지 후의 멤브레인의 두께는 56(±0.020)μm로 매우 얇은 필름 타입의 막임을 알 수 있었고, 수분 흡수시 약 64% 이상 평균 두께가 증가됨에 따라 본 발명의 일실시예에 따른 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막이 높은 수분 흡수율 및 보습율을 보유하고 있음이 확인되었다.

[0050] 도 4는 본 발명의 일실시예에 따른 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막의 세포독성 유무를 분석한 그래프이다.

[0051] 본 실험은 MTT분석법과 식약처 가이드라인에 따른 용출법을 이용하여 차단막을 DMEM(10% FBS포함된)에 침지시킨 후 37℃ 인큐베이터(incubator)에 24시간, 48시간, 72시간 동안 용출하였고, 획득한 용출액을 인간 조골세포인 MG63세포에 처리한 뒤 37℃ 인큐베이터(incubator)에 24시간 반응하였으며, MTT처리와 DMSO를 이용해 세포독성을 시험한 것이다.

[0052] 도 4의 그래프를 참조하면, 세포독성 결과 차단막 용출액은 컨트롤(100)보다는 세포수가 적지만 세포 독성에 큰 영향(50 이하는 존재하지 않음)을 나타내지 않음을 알 수 있다.

[0053] 도 5는 본 발명의 일실시예에 따른 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막의 세포부착능 분석 사진이다.

[0054] Cell live and dead assay는 살아있는 세포(Green calcein, green)와 죽은 세포(EtBR, red)를 구분할 수 있다. 플라즈마 처리하지 않은 것(도 5의 좌측), 플라즈마 처리한 것(도 5의 중앙), 시중에 판매되는 비흡수성 차단막(Cytoplast)(도 5의 우측)에 인간 조골세포인 MG63cell을 seeding하여 세포부착능을 비교하였다.

[0055] 도 5를 살펴보면, 결과에서 초록(green) 색깔을 띠는 세포를 보고 표면에 세포가 얼마나 붙었는지 비교할 수 있다. 산소 플라즈마 처리로 인해 차단막 양면이 음성(-) 전하를 띠는데, 음성(-) 전하를 지닌 세포는 플라즈마 처리하지 않은 멤브레인 보다 플라즈마 처리한 멤브레인의 세포부착력이 낮은 결과를 나타내었다. 이로 인해 플라즈마 처리한 멤브레인은 외부 세포부착력이 억제됨이 확인되었다.

[0056] 이는 외부 세포부착의 억제능을 지닌 미생물 바이오셀룰로오스 치과의료용 차단막의 구강 내 매식 및 골 재생유도 후 차단막 제거 시, 차단막에 부착될 수 있는 연조직으로 인한 조직손상을 최소화 시킬 수 있음을 제시한 것이다.

[0057] 도 6은 본 발명의 일실시예에 따른 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막의 수분흡수도 측정한 그래프이다.

[0058] 건조상태 멤브레인의 무게를 잰 후 PBS에 침지해 샘플들의 무게를 재어 수분 흡수도를 측정하였다.

[0059] 수분흡수도는 아래의 수학적 식 1으로 계산하여 침지시간에 따라 측정한 것이다.

수학식 1

$$\text{수분흡수도} = \frac{(\text{팽창 후 무게} - \text{건조 상태의 무게})}{\text{건조 상태의 무게}}$$

[0060]

[0061]

도 6의 그래프를 참조하면, 24시간 침지했을 경우 플라즈마 처리 하지 않은 멤브레인(파란색 선)이 가장 높은 수분흡수도(4.1)를 띠었지만, 30일간 침지한 경우에는 양면에 플라즈마 처리한 멤브레인(빨간색 선)이 가장 높은 수분흡수도(11)를 띠었다.

[0062]

아래의 표 2는 본 발명의 일실시예에 따른 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막의 인장강도를 측정한 결과이다.

표 2

[0063]

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

[0064]

건조상태의 멤브레인(2cm×5cm)을 인장강도 분석기(Instron 5543)로 측정하여 인장강도를 분석하였다.

[0065]

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.

[0066]

도 7은 동물실험을 통한 본 발명의 일실시예에 따른 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막의 골 전도성 분석을 위한 촬영 사진이다.

[0067]

즉, 도 7은 8mm defect 생성된 쥐(Rat)의 두개골에 본 발명의 일실시예에 따른 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막 이식 후 골 생성 여부에 대한 Photography, X-ray, micro-CT 촬영한 사진이다.

[0068]

쥐(Rat)의 두개골(Calvarial)에 8mm defect 생성 후 멤브레인 넣지 않은 그룹과 멤브레인(1cm×1cm)을 이식한 그룹을 설정하여 8주 동안 경과를 지켜보았다.

[0069]

탈회 조직표본을 제작하기 위해 골조직을 절단하여 조직절편 채득한 뒤 4% 파라포름알데히드(Paraformaldehyde) 고정액에 1주일 이상 4℃에서 고정시켰다.

[0070]

고정된 시편을 카메라로 외관을 촬영한 뒤, X-ray 촬영과, SKYSCAN 1076으로 micro-CT 촬영을 하였다.

[0071]

멤브레인을 사용한 두개골은 멤브레인을 사용하지 않은 두개골보다 골 형성이 빠르게 진행되는 것을 확인할 수 있었다.

[0072]

고정한 두개골은 EDTA에 담아 8주간 탈회법(decalcification)을 진행한 후 칼슘을 뺀 조직을 파라핀(Paraffin)으로 포매(embedding) 한 후 슬라이싱(slicing)하여 조직슬라이드(slide) 제작하였다.

[0073]

제작된 샘플은 H&E staining과 Safranin O and Fast green staining 조직학적 염색법을 진행하였다.

[0074]

도 8 및 도 9는 본 발명의 일실시예에 따른 8주간 탈회법을 진행한 차단막에 대한 Hematoxylin & Eosin staining 및 Safranin O and Fast green staining 조직학적 염색법 결과 사진이다.

[0075]

도 8을 살펴보면, H&E staining을 통해 세포의 핵(hematoxylin, blue)과 세포질(Eosin, red)을 염색하여 세포의 수와 모양변화를 확인할 수 있다.

[0076]

또한, 도 9를 살펴보면, Safranin O and Fast green staining을 통해 세포의 기질 속 proteoglycan(Safranin O, red)와 travicular bone(Fast green, green)을 염색하여 골 재생 여부를 확인할 수 있다.

[0077]

염색된 시편을 통해 defect 위를 덮었던 차단막 부분에서 신생골이 생성하였다는 것을 눈으로 확인할 수 있었다.

[0078]

상기와 같은 실험결과 본 발명에 따른 치과 의료용 바이오셀룰로오스 차단막 즉, *Gluconacetobacter xylinus*로부

터 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.

[0079] 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.

[0080] 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

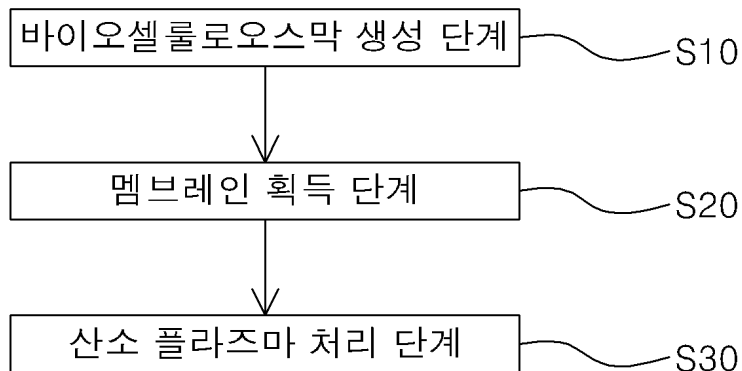
[0081] S10 바이오셀룰로오스막 생성 단계

S20 멤브레인 획득 단계

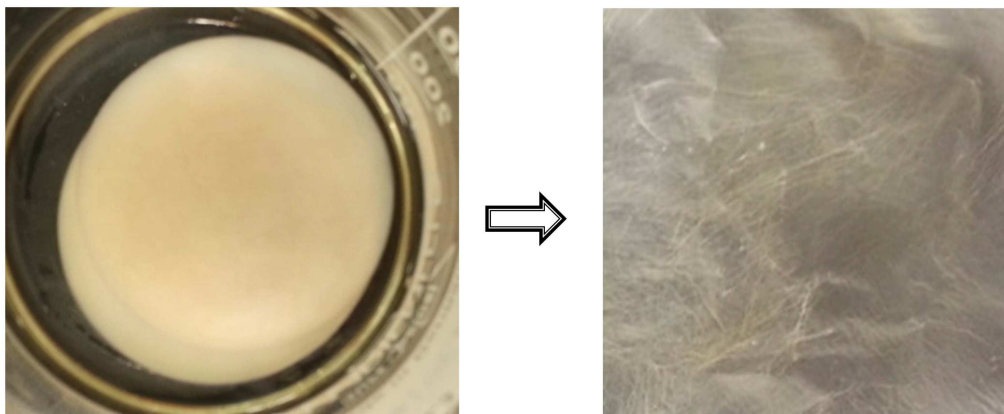
S30 산소 플라즈마 처리 단계

도면

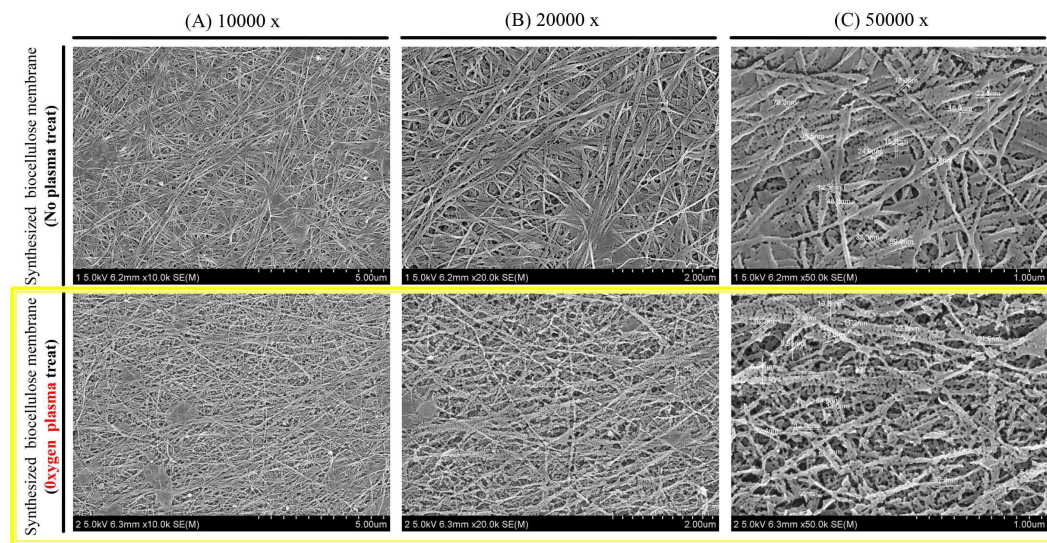
도면1



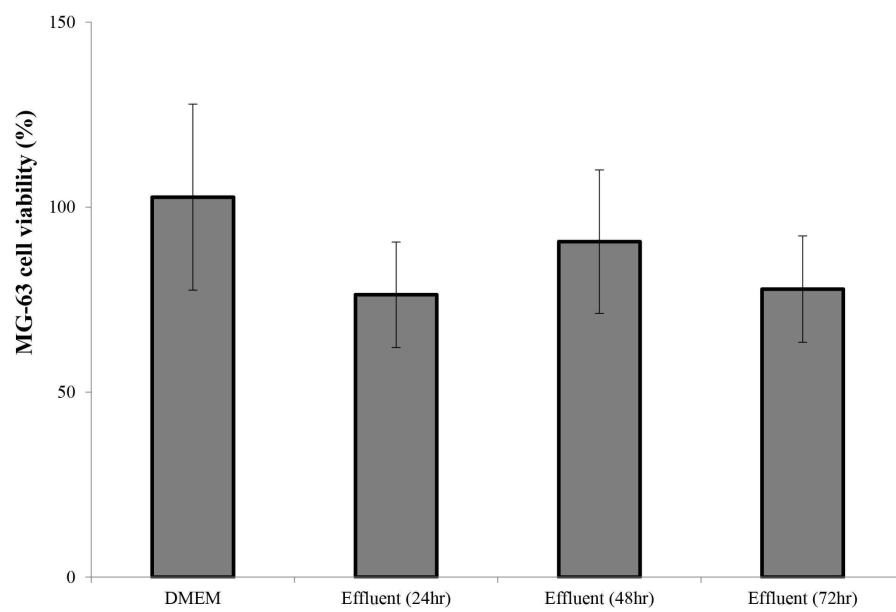
도면2



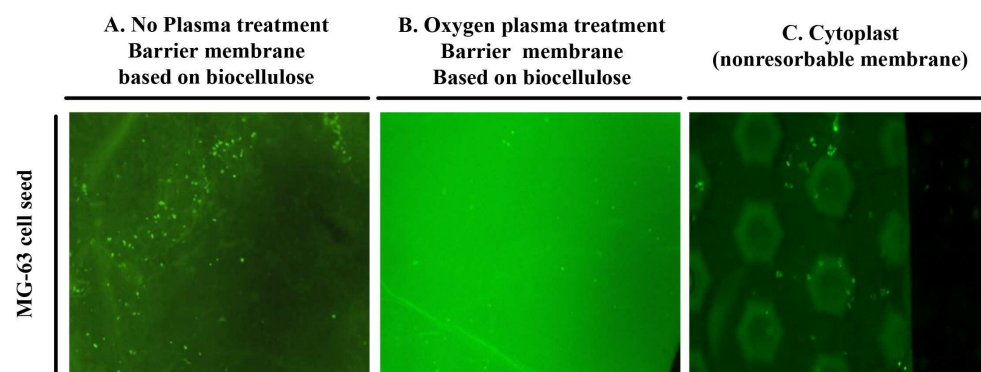
도면3



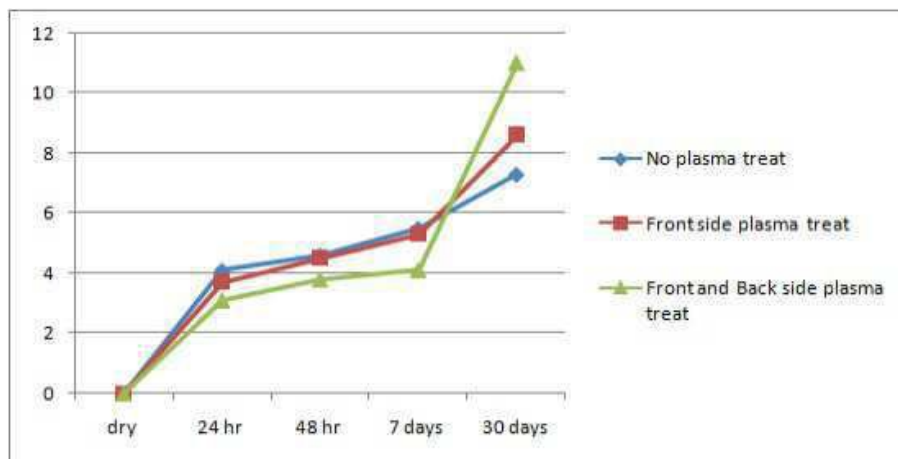
도면4



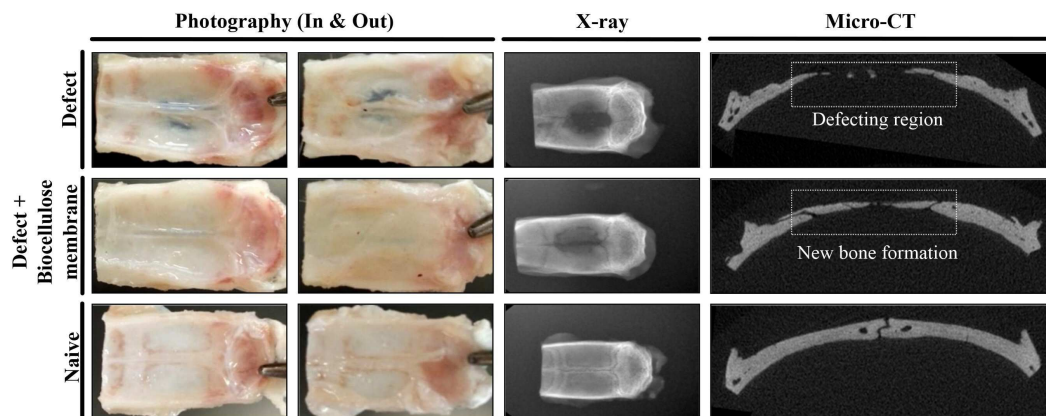
도면5



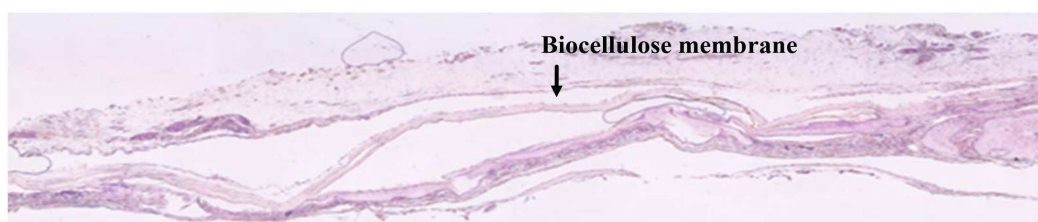
도면6



도면7



도면8



도면9

