

<표지>

(옆면)

(앞면)

116077-3

부잠사를
이용한
인공피부
개발용
실크기반
3D
프린팅
바이오
잉크의
개발

최
종
보
고
서

2019

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

보안 과제(), 일반 과제(✓) / 공개(✓), 비공개() 발간등록번호(11-1543000-002621-01)

농생명산업기술개발사업 제3차 연도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-002621-01

부잠사를 이용한 인공피부 개발용 실크기반 3D 프린팅 바이오잉크의 개발 최종보고서

2019.03.25.

주관연구기관 / (주)극동중앙연구소
협동연구기관 / 서울대학교산학협력단

농림축산식품부
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “부잠사를 이용한 인공피부개발용 실크기반 3D 프린팅 바이오잉크의 개발” (개발기간 : 2016.09.05.~ 2018.12.31.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019.03.18.

주관연구기관명 : (주)극동중앙연구소 (대표자) 박 재 윤
협동연구기관명 : 서울대학교산학협력단 (대표자) 윤 의 준



주관연구책임자 : 조 창 열
협동연구책임자 : 현 진 호

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	116077-03	해 당 단 계 연 구 기 간	2016.09.05 ~ 2018.12.31	단 계 구 분	(해당단계)/ (<u>총 단계</u>)
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	농생명산업기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세 부 과 제 명	부잡사를 이용한 인공피부개발용 실크기반 3D 프린팅 바이오 잉크의 개발			
연구책임자	조 창 열	해당단계 참여연구원 수	총: 9 명 내부: 9 명 외부: 0 명	해당단계 연구개발비	정부:341,000천원 민간:126,800천원 계:467,800천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 9 명 내부: 9 명 외부: 0 명	총 연구개발비	정부:341,000천원 민간:126,800천원 계:467,800천원
연구기관명 및 소속부서명	주관 : (주)극동중앙연구소 협동 : 서울대학교 산학협력단			참여기업명	(주)극동중앙연구소
국제공동연구	상대국명: 해당없음			상대국 연구기관명: 해당없음	
위탁연구	연구기관명: 해당없음			연구책임자: 해당없음	
※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음					
연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반 (국가연구개발사업의 관리등에 관한 규정 제 24조 4에 따른 분류에 해당사항이 없음)				

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고 서 원문	연구 시설 장비	기술 요약 정보	소프 트 웨어	화합 물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호	https://doi.org/10.1016/j.jiec.2017.12.032	제10-1881586호									
등록·기탁 번호	DOI:10.1021/acsami.8b05963	제10-1881587호									
등록·기탁 번호	https://doi.org/10.1016/j.jiec.2018.12.023	10-2018-0106130									

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호
-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-

<p>요약</p> <ul style="list-style-type: none"> - 실크 피브로인 정련공정 개발 및 대량생산 설비 구축 - 복합 바이오잉크용 광가교 고분자 대량생산 공정 개발 - 실크 피브로인 함유 복합 바이오잉크 개발 <ul style="list-style-type: none"> ① GelMA/가수분해 실크피브로인 함유 복합 바이오잉크 ② GelMA/실크피브로인 입자 함유 복합 바이오잉크 ③ 실크피브로인-멜라닌 입자 함유 복합 바이오잉크 ④ 실크피브로인-리보플라빈 복합 바이오잉크 ⑤ PEG4A/실크피브로인 함유 복합 바이오잉크 - DLP프린팅을 이용한 세포공배양 인공피부 구조체 제조 - 바이오잉크용 소재 4종 사업화 <p>(실크피브로인, 세리신, 광가교젤라틴, 광가교 실크피브로인)</p>	<p>보고서 면수 76 쪽</p>
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------

<요약문>

<p style="text-align: center;">연구의 목적 및 내용</p>	<p>본 연구는 누에고치로부터 실크섬유를 생산하는 과정에서 얻어지는 부잡사를 이용하여 보관 안정성이 우수한 실크 피브로인 기반의 3D 프린팅 바이오잉크를 개발하고 이를 인공 피부 제조에 응용함으로써 곤충유래 소재의 고부가가치화 및 산업화 가능성을 확인하고자 함.</p> <p>본 연구를 통해서 실크 피브로인을 기반으로 하는 바이오잉크를 제조하고 세포를 담지하는 삼차원 하이드로겔 인공피부 구조체를 프린팅 하고자함. 부잡사로부터 정련가능한 실크피브로인은 세포적합성이 우수하고 생체 내에서 면역반응을 일으키지 않는 것으로 보고되어 최근 조직공학용 지지체의 소재로 활발한 연구가 진행되고 있음. 그러나 실크 피브로인은 수용액상에서 불안정한 특성으로 인해 겔화거동을 조절하기 어려운 단점을 가지고 있어 현재까지 3D 프린터의 바이오잉크로 활용이 제한적이었음. 이에 본 연구진은 실크 피브로인과 광중합이 가능한 겔라틴 메타크릴아마이드를 복합화하여 광중합 방식의 3D 프린터용 바이오잉크를 개발하고자 함. 주요 연구내용으로는 1) 실크피브로인 정련 공정 개발 및 용해공정 개발 2) 실크 피브로인의 보관안정성 확보 3) 실크 피브로인의 기초 물성자료 및 점도특성 분석 4)겔라틴 메타크릴아마이드 실크 피브로인 복합 바이오잉크 제조 및 하이드로겔 특성 분석 5) 실크 피브로인의 DLP 방식 3D 프린팅 적용 가능성 평가 6) 실크피브로인 바이오잉크의 세포담지능 평가 7) 다중구조를 가지는 인공피부의 제조 8) 실크 피브로인 기반 바이오잉크를 활용한 시제품 제조를 진행하고자 함.</p>				
<p style="text-align: center;">연구개발성과</p>	<p>본 연구를 통하여 실크피브로인 기반 바이오잉크의 제조 시 실크 피브로인의 안정화 기술을 확보함에 따라서 이와 관련된 기술특허를 출원하고자 함. 또한 실크 피브로인과 겔라틴 메타크릴아마이드 복합 바이오잉크를 활용한 3D 바이오프린팅 잉크 개발 및 이를 이용한 인공피부 제작에 관한 기술특허를 출원하고자 함. 실크 피브로인을 활용한 바이오잉크 개발에 있어서 연구논문 1 편 (SCI 급 이상), 바이오잉크를 활용한 세포 프린팅 분야에 있어서 연구논문 1편, 다층 구조의 바이오잉크 프린팅을 이용한 인공피부 개발에 있어서 연구논문 1편을 각각 투고하여 실크 피브로인 기반 바이오잉크 분야에서 기술을 선점하고 이를 바탕으로 산업화 및 제품화에 적용할 기반을 마련할 예정임.</p>				
<p style="text-align: center;">연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>실크 피브로인은 우수한 생체적합성으로 인해 다양한 형태로 의료용 소재분야에서 활발한 연구가 진행되고 있을 만큼 상품화 및 산업화에 대한 잠재성이 매우 높음. 본 연구를 통해 개발된 실크 피브로인은 고순도이며 파우더화를 통해 장기간 보관이 가능하고 이용편의성이 우수함. 특히 세포를 담지한 바이오프린팅은 재생의학, 조직공학, 생명공학에서 많은 관심을 가지고 활발히 연구가 진행되고 있는 분야임. 체내에서 면역반응을 보이지 않는 높은 조직적합성으로 인해 실크 피브로인의 이용은 기존의 합성 소재 또는 이온성에 의한 겔화 소재와 비교하였을 때 실용화 가능성이 우수하다고 판단됨. 농가에서 배출되는 저비용의 부잡사를 이용하여 고부가가치의 바이오잉크분야로 활용 시 상품화 및 기업 활용도가 높다고 여겨지며 의료분야에서 필수적인 소재로 자리매김할 수 있을 것임. 바이오 3D 프린팅 산업의 연평균 성장률은 18.2%로 빠른속도로 성장하고 있으므로, 향후 실크 피브로인 기반의 바이오잉크제품의 시장경쟁력이 높을 것으로 예상됨. 인공피부 및 다양한 조직재생을 위한 바이오잉크 적용기술을 지속적으로 연구개발한다면 고령화를 대비한 산업적 측면에서도 매우 유망한 소재로 성장할 것이라 기대됨.</p>				
<p style="text-align: center;">국문핵심어 (5개 이내)</p>	부잡사	실크 피브로인	바이오잉크	세포 담지 하이드로겔	인공피부
<p style="text-align: center;">영문핵심어 (5개 이내)</p>	Silk waste	Silk fibroin	Bioink	Cell laden hydrogel	Artificial skin

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	6
1-1. 연구개발 목적	
1-2. 연구개발 필요성	
1-3. 연구개발 범위	
2. 연구수행 내용 및 결과	14
가. 실크 피브로인 정련공정 개발 및 대량생산 공정화	
(1) 고순도 실크 피브로인 제조	
(2) 가수분해 실크 피브로인 제조 및 물성평가	
(3) 실크 피브로인 제조 설비 구축 및 공정 최적화	
(4) 대량생산 실크 피브로인 특성평가	
나. 실크 피브로인 함유 복합 바이오잉크 제조 및 특성평가	
(1) 바이오 잉크용 광중합 고분자(GelMA) 제조	
(2) GelMA 대량생산 공정화	
(3) GelMA/가수분해 실크 피브로인 함유 복합 바이오잉크 제조 및 특성평가	
(4) GelMA/실크 피브로인 입자 함유 복합 바이오잉크 제조 및 특성평가	
(5) 실크 피브로인-멜라닌 입자 복합 바이오잉크 제조 및 특성평가	
(6) 실크 피브로인-리보플라빈 복합 바이오잉크 제조 및 특성평가	
(7) 피부유사 구조체 3D 프린팅을 위한 실크 피브로인 함유 바이오잉크 제조 및 특성평가	
다. 바이오 잉크용 소재 사업화	
(1) 제품화	
(2) 홍보	
라. 연구개발 성과	
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	64
3-1. 목표	
3-2. 목표 달성여부	
4. 연구결과의 활용 계획 등	73
가. 연구성과의 활용분야 및 활용방안	
나. 추가 연구의 필요성 및 타연구에의 응용	
다. 기업화 추진방안	
붙임. 참고 문헌	75

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

가. 실크피브로인 보관안정성 확보

실크 피브로인은 수용액상에서 단백질의 2차구조가 변화하여 물리적으로 가교된 하이드로겔을 형성한다. 그러나 하이드로겔 형성 시간을 조절하기 어려워 장기간 수용액상으로 보관하는데 문제가 있다. 이에 실크 피브로인의 보관안정성을 확보하기 위해 실크 피브로인의 단백질을 알칼리처리를 통한 가수분해 기술을 적용하여 저분자화 하고 추가적으로 동결건조과정을 거쳐 파우더를 제조하여 보관안정성을 극대화시키는 전략으로 실크 피브로인 바이오잉크를 제조하고자 한다. 이렇게 제조된 실크 피브로인 파우더의 경우 농도별로 재용해하여 용해도를 평가하여 최적의 농도 조건을 설정하고 상온에서 겔화가 이루어지기까지 걸리는 시간을 평가하여 보관안정성을 평가하고자 한다.

나. 광가교 유도 물질과의 혼화성 확보를 통한 실크 피브로인 기반 복합 바이오잉크 개발

실크 피브로인의 경우 광중합이 가능한 관능기를 가지고 있지 않으며 관능기화를 하는 과정에서 실크피브로인의 단백질 2차구조가 변화하여 겔화가 이루어지는 문제점이 있다. 이에 실크 피브로인과 광가교가 가능하면서 생체적합성이 우수한 재료로 알려진 젤라틴 메타크릴아마이드를 복합화하여 바이오잉크를 제조하고자 한다. 복합 비율을 다르게 설정하여 상분리 없이 복합화가 잘 일어나는 농도조건을 설정하고 농도조건에 따라 제조된 바이오잉크의 점도특성을 분석하고 추가적으로 광조사를 통해 제조된 하이드로겔의 물리 화학적 특성을 평가하고자 한다.

다. DLP 방식의 3D 프린팅을 이용한 바이오프린팅 기술 확보

제조된 실크 피브로인 기반 복합 바이오잉크를 기반으로 DLP 방식의 3D 프린팅을 통해 다양한 구조체를 제작해보고 광원의 파장, 광조사 세기, 광조사 시간에 따른 바이오잉크의 겔화거동을 평가하고 겔화시간을 측정하여 3D 프린팅에 적합한 최적조건을 설정하고자 한다. 세포적합성을 최대화하기 위해 광원의 파장영역을 자외선에서 가시광선으로 옮겨 하이드로겔을 제조하는 기술을 확보하고 3D 프린팅의 해상도를 높이고 프린팅 속도를 높이기 위해서 바이오잉크의 농도 및 점도조건을 최적화하는 기술을 확보하고자 한다.

라. 다층구조를 가지는 인공피부 프린팅

최적화된 3D 프린팅 조건을 기반으로 바이오잉크에 각질세포와 섬유아세포를 각각 분리하여 담지하고 DLP 3D 프린터를 이용하여 다층구조를 가지는 인공피부를 프린팅 하고자 한다. 이때 다른 구성비를 가지는 하이드로겔의 계면에서 박리가 일어나지 않는 조건을 확보하고 하이드로겔 내 세포생존율을 90%이상으로 유지하기 위해 양분공급을 최적화할 수 있는 혈관구조 도입 기술을 확보하고자 한다.

마. 부잡사의 가치 향상을 위한 신소재화 연구

견사 생산 후 남은 누에고치, 견사 생산에 부적합한 누에고치 및 절각견 등의 부잡사를 섬유 이외의 분야에 응용하기 위한 기술적 요인을 연구하고자 한다. 부잡사로부터 고순도의 실크 피브로인을 확보하기 위한 요건을 확인하고, 얻어진 실크 피브로인을 이용하여 인공피부 개발용 3D 프린팅 바이오잉크를 제조하고자 한다.

1-2. 연구개발의 필요성

가. 의류 중심의 전통적 양잠산업에서 기능성 양잠산업으로의 변화 추세임

- 실크는 누에가 만드는 천연 고분자로서 세리신과 피브로인이라는 단백질로 구성되어 있음.
- 1980년대까지 의류 등의 섬유로만 여겨지던 양잠이 1990년대에 누에분말을 이용한 항당뇨 식품으로 개발되기 시작하면서 비누, 화장품, 염모제, 치약 등의 생산 산업에 응용되어 오면서 현재는 기능성 양잠산업으로 산업이 재편되었음.
- 지난 2011년부터 2015년까지 정부는 양잠산업의 고품질 생산기반조성, 전문 인력육성 및 기술 교육강화, R&D 활성화 및 가공마케팅 강화, 제도개선 및 체계 정비의 5대과제를 제시하고 수행했던 바 있음.
- 오랜 세월동안 축적된 누에 사육기술, 풍부한 누에 유전자원 및 육종 기술을 보유하고 있어 실크단백질을 경제적으로, 친환경적으로 대량 생산할 수 있는 기반이 이미 조성되어 있음.
- 따라서 고기능성을 요하는 의료용으로 신소재로서 응용 시 고부가가치 산업으로 자리매김 할 수 있을 것임.



그림 1. 양잠 산업의 변화

나. 실크 단백질은 생체재료로서 우수한 특성을 지님

- 실크 피브로인 단백질은 면역반응을 일으키지 않고, 생체 내에서 분해가 가능하며, 세포독성이 없고, 조직적합성이 우수하기 때문에 의료용 생체재료로서 매우 적합한 물질임.
- 이러한 우수한 생체적합성을 갖는 실크단백질은 수천년 전부터 전통적으로 의료용 재료로서 이용되어왔고 의료용 기능성 제품으로 개발하고자 하는 노력이 많이 진행되어옴.
- 그러나 실크 단백질은 분자량이 30만 이상이나 되면서 구조적으로 매우 안정된 베타 시트 구조를 가지고 있을 뿐 아니라 화학적 안정성이 높아 유기 용매, 유기산 등에 대한 용해도가 낮음.
- 또한 실크 단백질은 보관안정성이 떨어짐. 특히 실크피브로인의 경우 수용액 상태에서 쉽게 굳어버림.
- 이처럼 기능성 양잠산업 연구의 일환으로 의료용 소재로서의 응용이 시도되고 있으나, 실크단백질이 가지는 본질적으로 낮은 가공성 때문에 실크단백질을 이용한 의료용 소재 개발에 대한 연구는 극히 제한적으로 진행되고 있음.

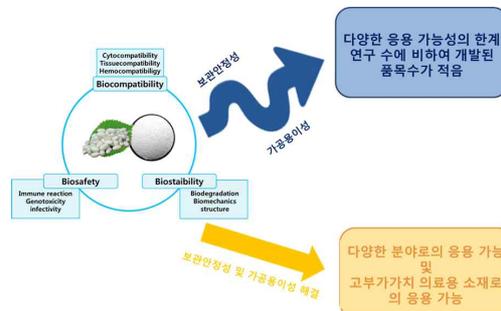


그림 2. 실크 단백질의 생체재료로서 응용 가능성

다. 새로운 산업으로서의 3D 프린팅기술이 대두됨

- 3D 프린팅은 4차 산업혁명이라는 말이 있을 정도로 인류의 삶을 크게 변화시킬 수 있는 기술로서 대두되고 있음.
- 3D 프린팅 기술을 이용할 시에 복잡한 구조를 쉽게 만들 수 있으며, 특히 개인 맞춤형 제품을 생산해 낼 수 있다는 장점이 있음.
- 3D 프린팅 기술에 대한 관심이 높아짐에 따라 3D 프린터 뿐만 아니라 그에 기반한 3D 스캐닝 기술, 3D 디자인 기술, 그리고 3D 프린터용 잉크 또한 많은 관심을 받고 있음.
- 특히 3D 프린터용 잉크의 경우 아직까지 상용화된 제품이 많지 않기에 그 발전 가능성이 매우 큰 산업분야라고 판단됨.
- 따라서 많은 기업들이 3D 프린터용 잉크 개발을 위하여 연구를 진행 중에 있으며, 특히 의료용으로 사용 가능한 바이오잉크 개발은 부가가치가 매우 큰 산업임.

라. 3D 프린팅 기술과 농생명산업의 결합을 통한 신성장동력산업화

- 쇠퇴하고 있는 농업과 발전하고 있는 3D 프린팅 기술의 결합을 통해 농업의 부가가치를 높일 수 있음.
- 특히 농업을 통해 얻는 친환경소재를 의료용 바이오잉크로 응용 시 농생명산업의 신 성장동력으로 육성이 가능할 정도로 그 부가가치가 매우 크다고 할 수 있음.
- 기능성 양잠은 노령화된 농촌인력 구조와 귀농자의 소득 작목에 적합하므로 4대강 유역에 뽕나무 벨트를 만들어 청정환경 보존과 수질 보호 등으로 활용하고 육성·지원한다면 신 성장동력산업으로서 무한한 잠재력을 보유하고 있음.
- 생체적합성이 우수하나 가공성의 한계로 인하여 한계점이 있는 실크 단백질을 바이오잉크로 이용할 수 있다면, 이는 양잠 산업분야의 발전뿐만 아니라 의료산업 발전에도 큰 영향을 줄 수 있을 것임.

마. 최종적으로 우리나라 양잠분야의 경제적 가치를 높이는데 기여

- 중국은 세계 실크생산량의 80% 이상을 차지하고 있으나 경제성장을 위해 토지를 이용하면서 양잠농가의 수가 줄어들고 있으며 그에 따라 실크생산량 또한 줄어들고 있는 추세임. 그 여파로 국제 생사가격이 상승하고 있어, 과거에 양잠산업 경쟁력이 컸었던 우리나라도 다시금 과거의 경쟁력으로 성장할 가능성이 전망되고 있음
- 국내의 잠종기술은 과거 2011년에 타지키스탄, 우즈베키스탄 등의 중앙아시아 국가로 수출된 적이 있는 등 중앙아시아 신흥 잠업 국가로 수출 가능성이 높아 기술이 더욱 발전됨에 따라 국제적 이윤을 창출할 가능성이 높아질 것으로 전망됨.
- 현재는 중국의 생사 시장이 큰 규모이기 때문에 생사의 가격이 국제 가격보다 국내 가격이 높아 수입에 의존하고 있으나 언제 국제 생사 가격이 폭등할지 모르는 상황임. 따라서 기능성 양잠의 개발로 인해 양잠 농가가 증가하게 되면 국제 가격이 폭등했을 때 경제적 이득을 얻을 수 있음.
- 특히 고부가가치 산업인 환자 맞춤형 의료용 소재로 응용 시 단순한 의복용 소재로서의 실크산업과는 비교가 불가한 산업적, 경제적 파급효과를 가져올 것으로 기대함. 이는 단순히 국내의 양잠 산업분야를 넘어서 전 세계 의료산업에 큰 영향을 줄 수 있을 것임.

1-3. 연구개발 범위

가. 1차년도 (2016.09 ~ 2016.12)

- 주관연구기관((주) 극동중앙연구소) :
 - 바이오 잉크 및 바이오 프린팅 문헌 조사 및 분석
: 기존의 연구 논문 및 특허 분석 및 제품 분석
 - 기개발 바이오잉크 재료특성 평가 및 분석
: 바이오잉크 재료에 대한 자료 수집, 및 영향인자별 특성분석
 - 실크 피브로인의 기초 물성평가
: 실크피브로인 의 물리적/화학적 특성 분석
: 실크 피브로인의 조건(농도, 온도 등)에 따른 점도 평가시험 진행
 - 실크 피브로인의 DLP 방식 적용 시 재료특성 파악
: 실크 피브로인의 DLP 프린팅 방식 적용 시 최적의 물성 및 점도조건 평가
- 협동연구기관(서울대학교) :
 - 실크 피브로인 추출(정련) 방법 확립
: Sodium oleate, sodium carbonate 농도와 정련시간이 순도에 미치는 영향 분석
 - 실크 피브로인 용해방법 확립
: Lithium bromide 농도, 용해시간조절을 통한 용해도 조절
 - 알칼리 처리를 통한 실크피브로인 단백질의 가수분해
: 알칼리 농도 및 처리시간 조절
: 가수분해된 실크 피브로인의 동결건조를 통한 파우더 제조
: 제조된 파우더의 용해특성 분석



그림 3. 1차년도 연구개발 범위

※ 1차년도에는 현재까지 연구된 바이오잉크와 바이오 프린팅 기술에 대한 분석을 실시하고, 실크 피브로인에 대한 기초 물성평가를 진행함. 이를 통해 실크피브로인이 가지는 점도적 및 물리적 특성에 대한 자료를 작성하고자 함.

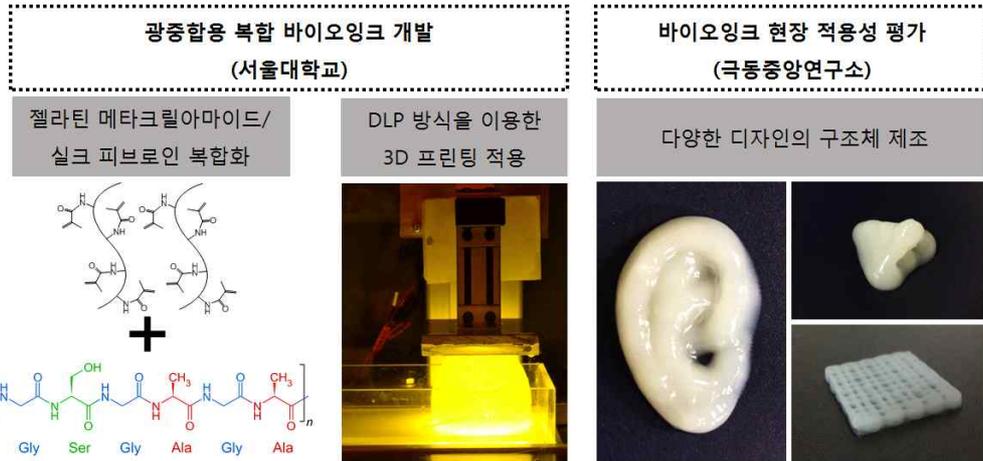
또한, 실크피브로인을 DLP 방식의 3D 프린터에 적용 시 발생될 수 있는 특이점을 파악하고자 함. 이러한 정보를 분석하여 DLP적용 시 요구되는 물성 요구치를 설계하고자 함. 또한 실크 피브로인의 추출 방법을 확립하고 실크 피브로인의 용해방법을 확립하고자 함. 실크 피브로인의 경우 수용액상에서 단백질의 2차구조가 random coil 구조에서 β -병풍구조로 변화함에 따라서 물리적인 가교가 된 형태의 하이드로겔이 제조됨. 그러나 실크의 물리적 가교결합의 경우 가교속도를 조절하기가 어려울 뿐 아니라 가교위치를 지정하기가 어려운 문제로 인해 3D 프린터용 바이오잉크로서의 그 활용도가 제한적이었음. 이에 알칼리처리를 통한 실크 피브로인 단백질의 가수분해를 유도하고 이를 파우더화하여 보관안정성을 높여 범용 바이오잉크로서의 활용가능성을 높이고자 함. 뿐만아니라 파우더의 용해성을 향상시키기 위한 방안으로 알칼리 처리시간의 조절 및 LiBr에 의한 용해시간의 조절을 병용하고자 함. 최종적으로는 두 복합기작을 비교함으로써 효과적인 보관안정성 향상 기술을 확보하고자 함. 또한 제조된 파우더의 용해특성을 농도별로 파악하고 제조된 수용액의 점도특성을 분석함으로써 DLP 방식의 바이오잉크에 적용하기 적합한 최적의 점도범위를 확인하고자 함.

나. 2차년도 (2017.01 ~ 2017.12)

- 주관연구기관((주) 극동중앙연구소) :
 - 실크피브로인 정련 설비 구축 및 공정의 최적화 설계
 - : 협동연구기관(서울대학교)에서 설계한 실크피브로인 정련공정에 대한 현장 적용 평가
 - : 실크 피브로인 정련공정 최적화 설계
 - 3D 프린터를 이용한 다양한 디자인의 구조체 제조 및 평가
 - : 크기별 구조체 제조 시간 분석
 - : 구조체 제조시간 단축을 위한 요인 분석
 - 1) 재료의 농도 및 치환도 조절을 통한 광중합 시간 단축시험
 - 2) 광원의 세기 조절을 통한 광중합 시간 단축시험
- 협동연구기관(서울대학교) :
 - 젤라틴 메타크릴아마이드 실크 피브로인 복합 바이오잉크 제조
 - 1) 메타크릴기가 도입된 젤라틴 메타크릴아마이드의 합성 및 파우더 제조
 - 2) 실크 피브로인 파우더와 혼입 및 용해
 - 3) 용해도 특성 분석
 - 4) 젤라틴 메타크릴아마이드 및 실크 피브로인의 혼입비에 따른 겔화 거동 분석
 - 실크 피브로인의 DLP 방식 3D 프린팅 적용 가능성 평가
 - 1) DLP 방식의 3D 프린터 광원에 따른 겔화 시간 평가
 - 2) DLP 방식의 프린터 배드와 하이드로겔 사이의 부착능 평가
 - 3) 프린터 배드와 하이드로겔 사이의 부착능 향상을 위한 요인 분석
 - a) 프린터 배드의 표면 재질
 - b) 고분자 농도
 - c) 광조사 시간
 - 4) 3D 프린팅 해상도 평가
 - 5) 3D 프린팅 해상도 향상을 위한 요인 분석
 - DLP 방식의 3D 프린터로 제조된 실크피브로인 기반 하이드로겔의 특성 분석
 - 1) 기계적 강도 평가 - UTM, Digital rheometer
 - 2) 함수율 평가

3) 표면 구조 분석 및 공극도 분석 - SEM

4) 세포 적합성 평가 - MTT assay test를 통한 세포 생존율 평가



복합 바이오잉크 개발 및 현장 적용기술 확보

그림 4. 2차년도 연구개발 범위

※ 2차년도에는 제조된 실크피브로인 파우더와 광중합 가능한 관능기를 가지는 젤라틴 메타크릴아마이드를 혼입하여 복합 바이오잉크를 제조하고 이를 직접 DLP 방식의 3D 프린터에 적용 3차원의 구조체를 제작해 보고자 함. 복합화 된 바이오잉크를 농도별로 용해시켜 용해특성을 확인하고 두 재료의 농도비에 따른 하이드로겔의 특성을 분석해보고자 함. 제조된 바이오잉크의 3D 프린터용 잉크 적합성 평가를 위해 직접 DLP 방식으로 3차원의 구조체를 제조해보고, 세포독성을 최소화하기 위해 사용되는 광원을 가시광선영역의 파장대로 설계하고 가시광선영역에서 개시를 하는 광 개시제인 Eosin Y를 사용하고자 함. DLP 방식을 이용함에 있어 중요한 점인 프린터 배드와 하이드로겔 사이의 부착능을 평가해보고 부착능을 높이기 위해 프린터 배드에 하이드로겔과 부착할 수 있는 재료를 코팅하여 3D 프린팅을 진행하고자 함. 뿐만 아니라 실크 피브로인을 기반으로 프린팅 시 겔화 거동 및 프린팅 해상도를 평가하고 제조된 복합 바이오잉크 기반 하이드로겔의 특성을 분석해보고자 함. 최적화된 실크 피브로인 기반 바이오잉크를 이용하여 다양한 디자인의 3차원 구조체를 직접 프린팅해보므로써 복합 바이오잉크의 범용성 및 상용성을 평가해보고자 함.

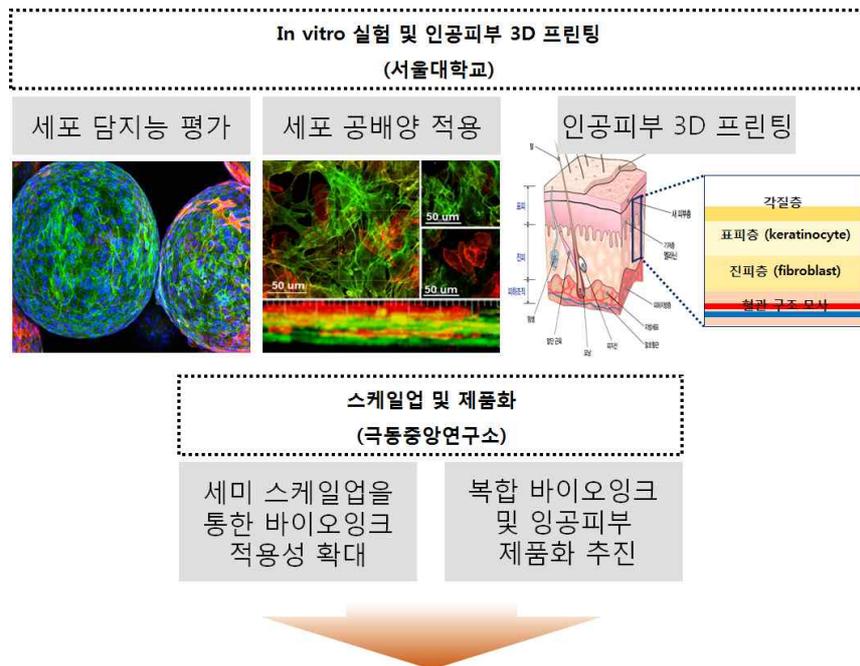
다. 3차년도 (2018.01 ~ 2018.12)

- 주관연구기관(주) 극동중앙연구소 :

- 실크 피브로인 기반 바이오잉크를 3D 프린팅에 적합한 DLP 방식의 3D 프린터 최적화 평가 : DLP 3D 프린터에 바이오잉크 적용 및 제품 모니터링
- 세미-스케일업(semi-scale up)된 대용량 바이오잉크 제조 시스템 설계
 - 1) 파일럿 규모의 반응조 (최소 5L 이상) 제작 및 운전
 - 2) 2차년도 연구결과 반영한 적절한 조성비의 바이오잉크 제작 설비 구축, 균일한 교반 및 열전도 시스템 확보
 - 3) 대용량 바이오잉크 제조에 따른 특성 분석
 - 4) 기존의 랩스케일 소규모 제조 결과와 비교 및 분석

- 협동연구기관(서울대학교) :

- 생체재료 전문가 자문 위원회 구성 및 자문위원 위촉
- NIH 3T3 cell line 을 이용한 세포담지능 평가
 - 1) 실크 피브로인의 점도특성 조절을 통한 세포부유특성 부여
 - 2) 담지된 세포의 구조체내 층별 세포 생존을 평가
 - a) MTT assay를 이용한 세포생존률 분석
 - b) Alamar blue assay를 이용한 세포 대사량 분석
 - 3) 세포 생존율을 높이기 위한 요인 분석
 - a) 재료의 농도에 따른 세포생존율 비교
 - b) 광원의 세기 및 광 조사 시간에 따른 세포 생존율 비교
 - c) 하이드로젤 내부 채널 형성 유무에 따른 세포 생존율 비교
- DLP 방식을 통한 세포 공배양 적용가능성 확인
 - 1) 서로 다른 세포를 함유하는 실크피브로인 기반 바이오잉크를 이용한 다층구조의 구조체 제조
 - 2) 실크 피브로인 기반 바이오잉크의 농도 차에 따른 하이드로젤 경계에서의 접착 여부 평가
 - 3) 하이드로젤 내 공배양된 이식 세포의 생존율 및 생존 기간 확인
- 다층구조를 가지는 인공피부의 제조
 - 1) 각질세포 (keratinocyte) 및 섬유아세포 (fibroblast)를 각각 바이오잉크에 혼입
 - 2) 3D 프린터를 이용하여 섬유아세포로 구성된 진피층 제조 (혈관 구조 도입)
 - 3) 프린터 배스(bath)를 옮기는 방식으로 각질세포와 멜라닌 세포로 구성된 각질층 제조
 - 4) 제조된 피부구조 내 세포 생존율 분석 (혈관의 유무에 따른)
 - 5) 피부구조 내 층간 접착특성 분석



바이오잉크를 통한 인공피부 개발 및 제품화

그림 5. 3차년도 연구개발 범위

※ 3차년도에는 2차년도에 확보된 실크 피브로인 기반 복합 바이오잉크의 최적특성을 바탕으로 대용량 바이오잉크 제조시스템을 구축하고자 함. 최소 5L의 파일럿 규모의 반응조를 운전하여 바이오잉크의 적용성을 확대하고 기존의 랩스케일로 제작된 바이오잉크와 특성비교를 통한 대량생

산 가능성을 확인하고자 함. 뿐만 아니라 실크 피브로인 기반 복합 바이오잉크에 세포를 담지하여 3차원 구조체를 제조하여 세포 담지능을 평가하고자 함. 세포 생존율을 평가하고 세포생존율을 높이기 위한 방안으로 바이오잉크의 농도조건 설정 및 광원의 세기 조절, 광 조사 시간 조절, 하이드로겔 내부 채널 디자인 등의 방법을 이용하고자 함. DLP 방식을 이용함에 따라서 서로 다른 세포를 하나의 하이드로겔 내부에 담지하는 세포 공배양 기술을 확보하고자 함. 종류별 세포에 다른 조성비를 가지는 바이오잉크를 적용하고 최적의 바이오잉크를 이용하여 다층구조의 하이드로겔을 제조하고자 함. 이에 다층구조를 가지는 인공피부를 제조하여 동물실험을 대체할 피부 모델을 제조할 수 있을 것으로 기대됨.

2. 연구수행 내용 및 결과

가. 실크 피브로인 정련공정 개발 및 대량생산 공정화

(1) 고순도 실크 피브로인 제조

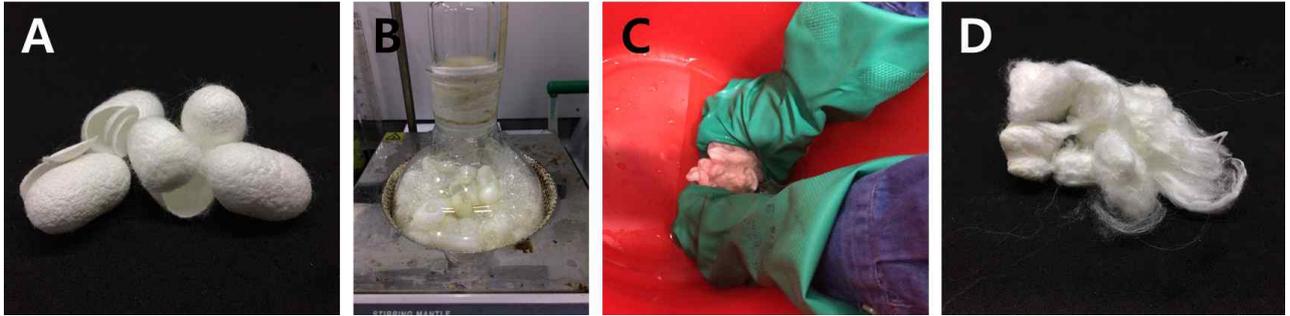


그림 1. (A) 정련 전 누에고치 사진, (B) Sodium Oleate, Sodium Carbonate를 이용한 정련 공정 사진, (C) 증류수를 이용한 추가 세정 과정 사진 (D) 정련공정으로 인해 세리신이 제거된 실크 피브로인 사진

증류수를 끓인 후 계면활성제를 첨가하여 용해시키고, 40g의 누에고치를 첨가하여 85°C에서 1시간동안 가열하여 실크세리신을 제거하였다. 추가적으로 흐르는 증류수로 5회 세정과정을 거쳐 실크 피브로인을 얻었다. 정련공정을 거치면서 누에고치는 섬유끼리 얽힌 견고한 구조를 유지하지 못하고 풀린 구조의 섬유 다발 형태를 띠었으며 이어서 습윤 상태로 이용하거나 건조과정 후에는 데시케이터에 넣어 보관하였다 (그림 1).

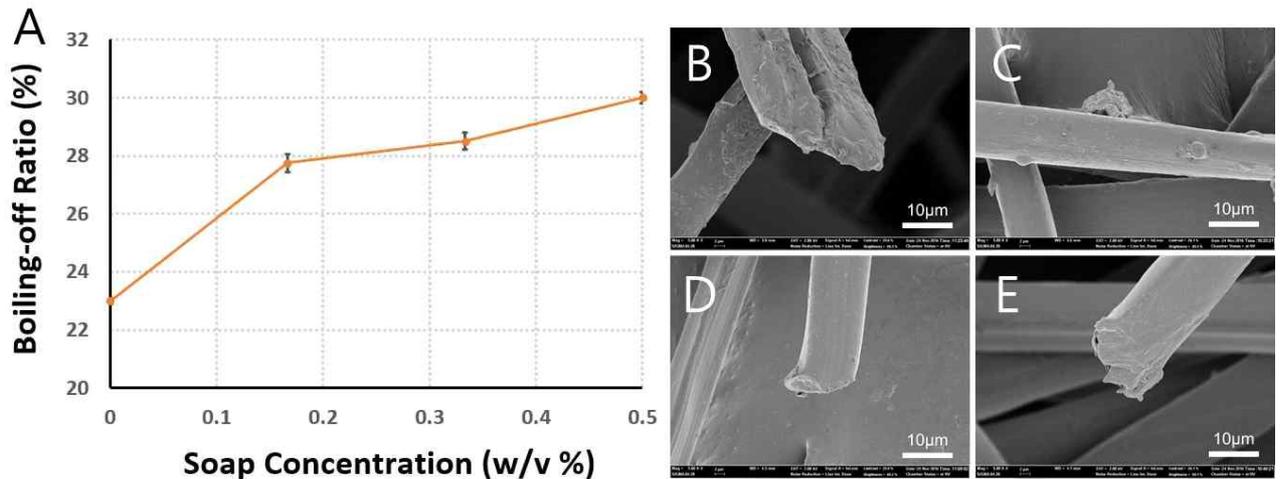


그림 2. (A) 계면활성제 농도 조절에 따른 연감률. 계면활성 농도에 따른 실크 섬유 표면의 주사전자현미경 사진: (B) 0 w/v%, (C) 0.16 w/v%, (D) 0.33 w/v%, (E) 0.5 w/v%

고순도의 실크 피브로인을 추출하기 위한 계면활성제 첨가 조건을 설정하고자 하였다. 실크 정련 공정에 있어서는 기존 문헌에서 제시하고 있는 sodium oleate와 sodium carbonate를 3:2 비율로 혼합한 계면활성제를 사용하였다. 그림 2에 나타난 바와 같이 실크 고치 40g에 대하여 혼합 계면활성제의 농도를 변화시켜 정련을 실시하였다. 혼합계면활성제를 사용하지 않은 경우에도 연감률이 23%로 나타났으며, 혼합계면활성제의 첨가량이 증가함에 따라 연감률이 지속적으로 증가하였다. 그러나 연감률만으로 실크 피브로인의 순도를 평가할 수 없기 때문에 전자현

미경 관찰을 통하여 세리신의 제거 여부를 확인하고자 하였다. 그림2B~2E에서 확인되는 바와 같이, 혼합계면활성제를 사용하지 않은 경우 표면의 거칠기가 매우 심하고, 실크 피브로인 섬유가 잔류하는 실크 세리신에 의해 두 가닥으로 완전히 분화되지 않은 것을 확인할 수 있었다. 반면에, 혼합계면활성제의 첨가량이 증가함에 따라 실크 피브로인 표면에 잔류하는 세리신이 현저히 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 0.5 w/v% 혼합계면활성제 (sodium oleate 3g, sodium carbonate 2g)를 사용하는 경우 실크 피브로인 표면에 요철이 관찰되어 세리신의 제거 이후에 추가적으로 실크 피브로인 자체의 제거가 실시되고 있는 것으로 판단되었다. 본 과제에서는 고순도의 실크 피브로인을 추출하여 생체적합성 소재로 이용하고자 하는 것을 목표로 하고 있는 바 혼합계면활성제의 첨가량을 0.5 w/v%로 고정하여 이후 정련공정을 실시하였다.

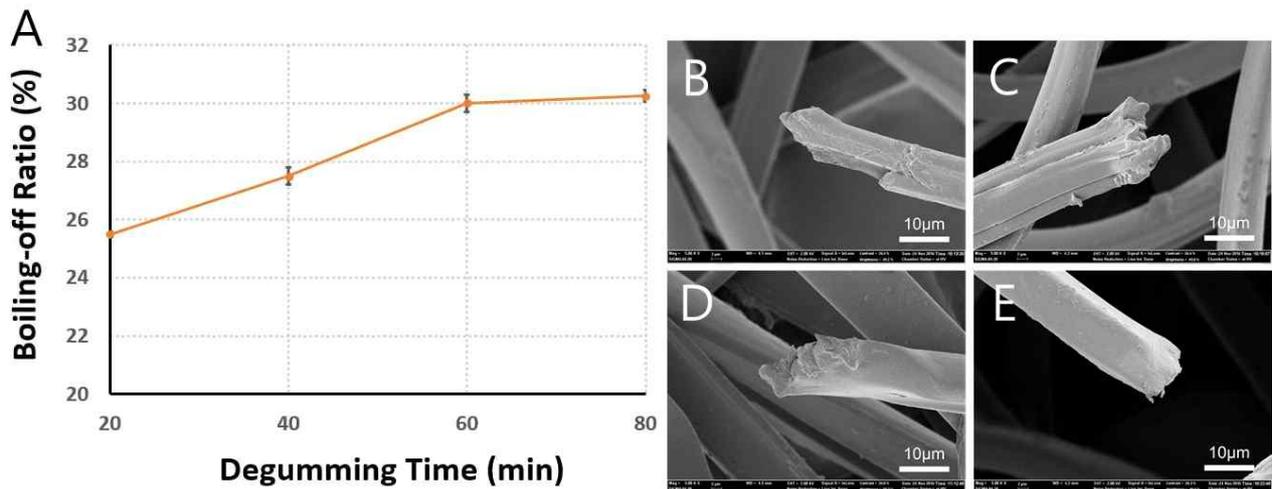


그림 3. (A) 정련 시간에 따른 연감률 비교. 정련 시간에 따른 실크 섬유의 주사전자 현미경 사진. (B) 20분, (C) 40분, (D)60분, (E)80분.

혼합계면활성제의 양을 0.5 w/v%로 고정하고 정련시간을 20, 40, 60, 80분으로 조절하여 연감률의 변화를 살펴보았다. 정련 시간이 증가함에 따라 연감률이 점차적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 정련 시간이 증가함에 따라 용해되어 추출되는 세리신의 양이 점차적으로 증가한 결과 60분 이후에는 연감률에 큰 변화가 관찰되지 않았고 따라서 정련 최적시간을 60분으로 설정하였다. 주사전자현미경을 이용하여 정련 시간에 따른 세리신의 잔류 유무 및 섬유 표면의 손상도를 관찰하였다. 그 결과 60분 이상 정련을 한 시료에 대해서는 실크 피브로인 표면에 세리신이 거의 남아있지 않는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 최적의 실크 피브로인 정련 시간을 설정할 수 있었다. 이에 이후 실험에서는 최적치로 판단되는 60분을 정련시간으로 하여 실크 피브로인을 제조하였다.

(2) 가수분해 실크 피브로인의 제조 및 물성 평가

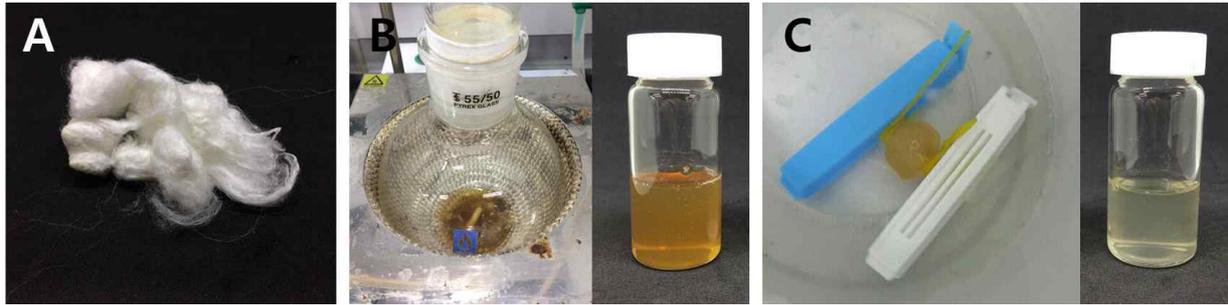


그림 4. (A) 정련된 실크 피브로인 섬유 사진, (B) Li염류 용액을 이용한 실크 피브로인의 용해 공정 및 용해 직후 제조된 실크 피브로인 용액 사진, (C) Li염류 제거를 위한 투석과정 및 투석 후 제조된 실크 피브로인 수용액 사진.

실크 피브로인을 하이드로젤로 제조하여 생체재료로 사용하기 위해서 우선적으로 실크 피브로인의 용해공정을 확립하였다. 정련된 실크 피브로인은 9.3M의 Li염류 수용액에 용해시키는 과정을 거친다. 실크 피브로인과 용매의 비율은 0.2g/ml로 설정하였고, 이때 온도는 60°C, 용해 시간은 1시간으로 고정하였다. 용해과정을 거치게 되면 짙은 갈색의 실크 피브로인 Li염류 수용액을 얻을 수 있다 (그림 4B). 그러나 과량의 염으로 인해 생체재료로 바로 활용하는 것은 불가능하여 12~14kDa의 molecular cutoff를 가지는 셀룰로오스 아세테이트 막을 이용하여 3일간 흐르는 증류수에 투석하여 실크 피브로인 수용액을 얻을 수 있었다 (그림 4C). 불순물을 제거하기 위해 3000G에서 10분간 원심분리 하여 상등액을 얻었다.

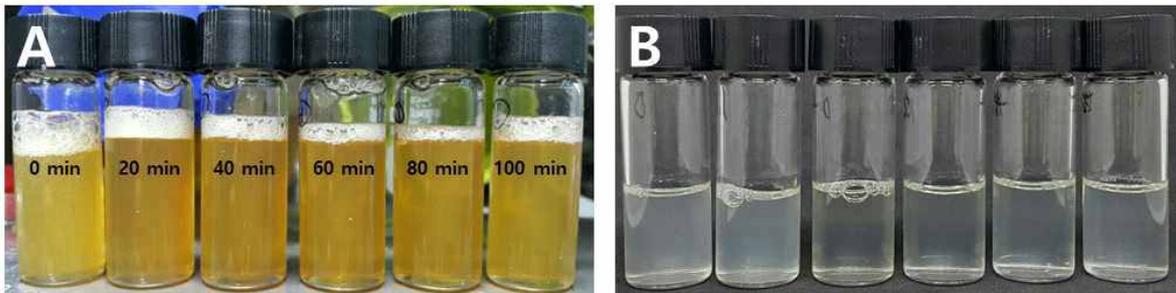


그림 5. 알칼리 처리시간 조절을 통해 가수분해된 실크 피브로인 용액 (A) 투석 전, (B) 투석 후

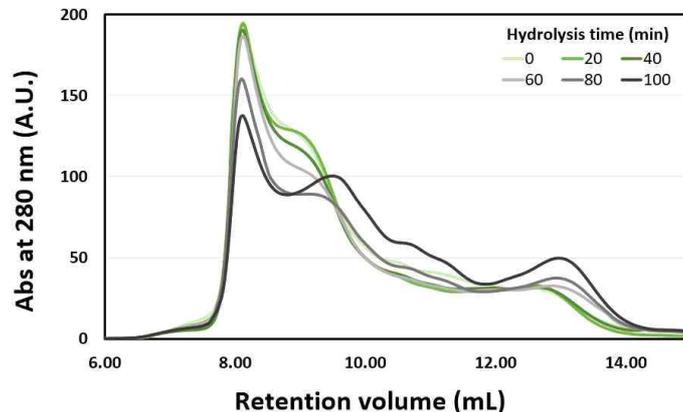


그림 6. 알칼리 처리시간 조절을 통해 가수분해된 실크 피브로인 용액의 분자량 분포도

Li염류 수용액을 이용한 실크피브로인의 용해과정 중에 실크피브로인 용액 내 수산화나트륨의 농도를 0.1M로 고정하여 투입하고 80°C에서 가수분해를 진행하였다. 이때 반응시간을 0분에서 100분까지 20분 간격으로 조절하였으며 Li염류에 실크 피브로인을 녹여 용액을 얻은 즉시 NaOH를 투입하여 반응시켰다. 가수분해 반응이 진행된 직후 시료들의 경우 황갈색을 띠는 것을 확인할 수 있었고 (그림 5A), 투석 후 시료들은 반응시간이 증가함에 따라 용액의 투명도가 높아지는 것을 확인할 수 있었다(그림 5B).

반응 시간에 따라 실크 피브로인이 가수분해 되는 정도를 분자량 분석을 통해 알아보았다 (그림 6). 고속 액체 크로마토그래피를 통해 분자량 분석을 한 결과, 가수분해 처리 시간이 증가함에 따라 실크 피브로인 단백질의 분자량 분포가 감소하는 경향이 있음을 확인할 수 있었다. 알칼리 처리하지 않은 실크피브로인의 경우 8.12 mL(~443kDa) 부근에서 좁은 단일 피크가 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 가수분해처리 시간이 증가함에 따라 9.50mL (~200kDa) 부근에서 피크가 점차 증가하는 경향을 보였다. 80분 이상 가수분해 처리된 실크피브로인 단백질의 경우 13.0mL (~17kDa) 부근에 피크 지배적으로 나타났으며 이를 통해 알칼리 처리 시간이 증가함에 따라 실크 피브로인의 분자량이 점차 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

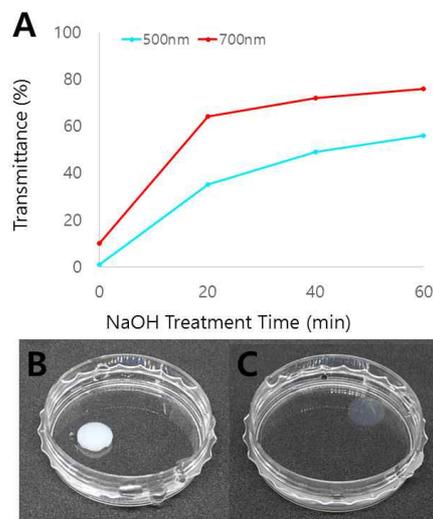


그림 7. (A) 가수분해 처리 시간에 따른 투과도 비교, (B) 무처리 실크피브로인 하이드로젤과 60분 가수분해 처리된 실크피브로인 하이드로젤 사진.

그림 7A는 가수분해 처리 시간에 따른 실크 피브로인 하이드로젤의 투명도를 자외선 가시광선 분광광도계를 이용하여 측정한 결과이다. 처리 시간이 증가함에 따라서 투명도가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 무처리된 실크 피브로인 하이드로젤의 경우 500 nm 파장의 빛은 거의 투과되지 않았으며 700 nm 파장대의 빛은 약 10% 가량 투과하는 것을 확인할 수 있었다. 뿐만 아니라 더 긴 파장대의 빛에서 투과도의 차이가 크게 나타나는 것을 확인할 수 있었는데 이러한 차이는 실크 피브로인 입자의 크기에 기인한다. 실크 피브로인 하이드로젤의 투명도는 하이드로젤을 구성하는 실크 피브로인 입자의 크기가 가시광선 파장범위에 비해 작은 경우 높아지며 가수분해처리로 인해 실크피브로인 고분자의 분자량이 작아짐에 따라 입자의 크기가 작아져 투명도가 높아지는 것을 알 수 있다. 가수분해 처리시간이 60분까지 증가함에 따라 700

nm 파장대의 빛에 대한 투과도는 약 80% 정도로 매우 높게 나타났음을 확인할 수 있었다.

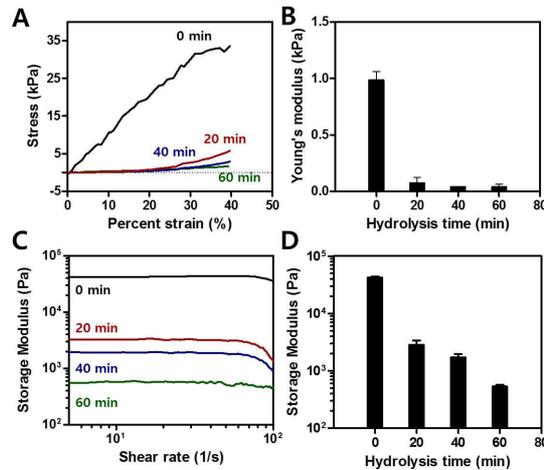


그림 8. (A) 가수분해 처리시간에 따른 압축강도 응력-변형률 그래프 (B) 가수분해 처리시간에 따른 압축강도 탄성계수 (C, D) 가수분해 처리시간에 따른 전단변형률에 대한 저장탄성률

알칼리 처리시간에 따른 실크 피브로인 기반 하이드로젤의 강도를 평가하기 위해 가수분해된 하이드로젤 용액을 초음파 분쇄기를 이용하여 5분간 90%의 세기로 처리하였다. 이후 슬라이드 글라스 사이에 용액을 주입하여 용액이 실크 피브로인간 물리적 가교결합이 형성될 때까지 기다리고, 하이드로젤이 형성된 후 높이 1.6 mm 직경 8 mm의 원통형 디스크 형태로 제작하여 만능재료시험기 (UTM, GB/LRX Plus, Lloyd, UK)를 이용하여 압축강도를 평가하였다. **그림 8A**는 가수분해 처리시간에 따른 압축강도 응력-변형률 그래프를 보여준다. 무처리 실크피브로인 기반 하이드로젤의 경우 40%의 변형률에서 약 35 kPa의 높은 압축강도를 보였으나 가수분해 처리가 된 실크 피브로인 기반 하이드로젤의 경우 압축강도가 현저히 떨어지는 결과를 보였다. 압축강도 탄성계수를 비교해보았을 때 무처리된 실크 피브로인 하이드로젤 대비 7%까지 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 강도의 감소는 디지털 레오미터 (MARS III, ThermoScientific)를 통한 전단응력시험을 통해서도 확인할 수 있었다. 압축응력 결과와 마찬가지로 하이드로젤의 전단강도 또한 가수분해 처리 시간에 따라 감소하는 경향을 보였다. 이러한 실크 피브로인의 가수분해에 따른 기계적 물성의 감소는 가수분해에 따른 분자량의 감소에 기인한다.

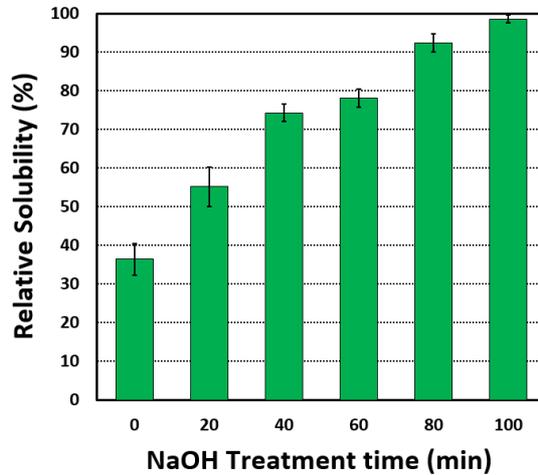


그림 9. 가수 분해 처리 시간에 따른 재용해도의 상대값. (각 샘플의 재용해도는, 동결건조 후 분말화 한 실크 피브로인 단백질을 상온에서 5 wt% 농도로 10분간 녹인 후, 10000 RPM으로 원심분리한 뒤 상등액만을 얻어 측정)

가수 분해된 실크 피브로인 단백질의 재용해도는 동결 건조된 분말이 무처리 실크 피브로인 단백질에 비해 높은 수준을 보였다. 실크 피브로인 분말을 증류수에 5 wt%로 용해하여 동결 건조하기 전 5 wt%의 실크 피브로인 수용액과 흡광도 비교를 통해 용해도를 확인하였다. 그 결과 무처리 실크 피브로인 단백질의 경우 약 1.82 wt%가 재용해 되었고 약 3.17 wt%는 고형분 상태로 남았다. 20분간 처리한 경우에는 약 2.76 wt%가 재용해 되었고 약 2.23 wt%는 고형분 상태였다. 마찬가지로 40, 60분간 처리한 경우에는 각각 약 3.71, 3.90 wt%가 재용해 되었고 각각 약 1.28, 1.09 wt%는 고형분 상태였다. 80분간 처리한 경우에는 약 4.61 wt%가 재용해 되었으며 고형분은 0.38 wt%였으며 재용해도는 동결건조 전 실크 피브로인 용액의 92.3%로 나타났다. 100분간 처리한 경우에는 약 4.93 wt%가 재용해 되었고 고형분은 0.07wt%였으며 재용해도가 98.6%로 높게 나타났다. 알칼리 가수 분해 처리 시간이 증가함에 따라 실크 피브로인 분말의 재용해도가 점차 증가하였다. 100분 처리한 실크 피브로인 분말은 98% 이상의 재용해도 값을 보여 동결 건조를 통한 보관안정성의 확보가 용이할 것으로 판단된다.

(3) 실크 피브로인 제조 설비 구축 및 공정의 최적화

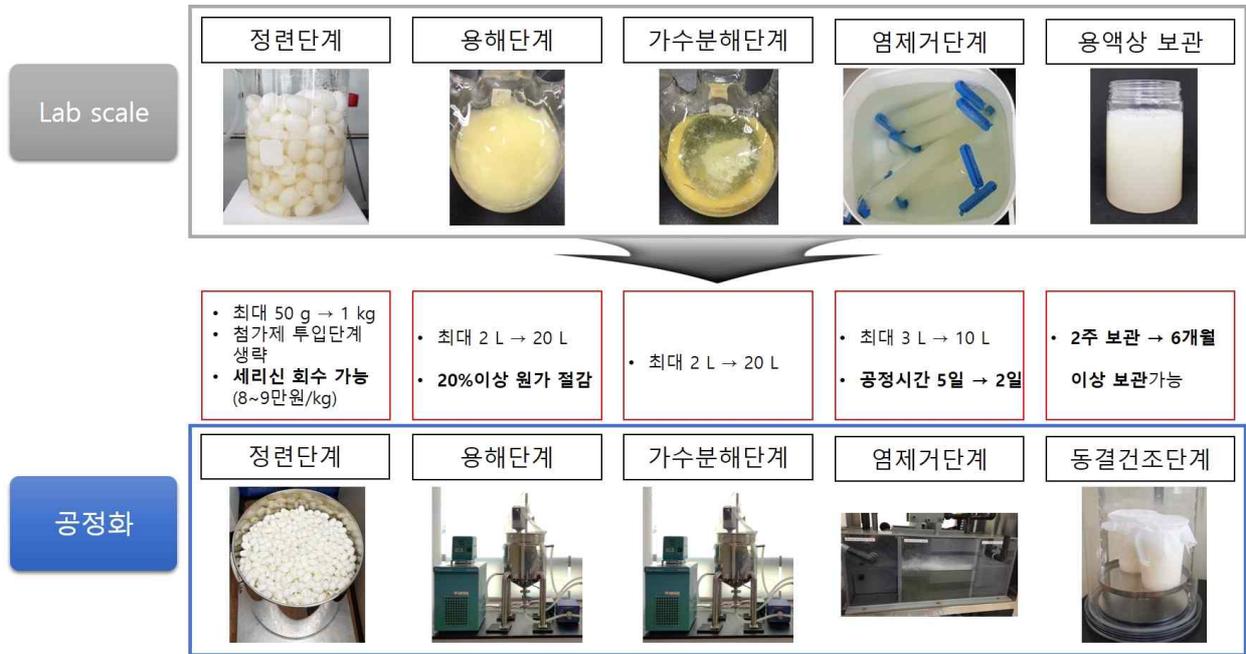


그림 10. Lab scale과 공정화 했을 때의 제조 공정 사진 및 차이점 비교

1차년도 과제에서 확립한 일련의 단계들을 개선하고 공정화 설비를 도입하여 산업화하는데 더욱 적합하도록 하는 방안에 대해 연구하였다. 그림 10에서 보이는 바와 같이 실크 피브로인 정련 설비 구축 및 공정 최적화를 통해 제조 원가 절감(20%이상), 생산량 증가(3~10배), 공정 시간 단축(약 3일)의 결과를 얻을 수 있었다.

(가) 정련공정 최적화



그림 11. 증류수를 이용한 실크 피브로인 대량 정련 사진. a. 정련 전 누에고치 사진(0.87kg). b. 대량 정련 후 세리신이 제거된 실크 피브로인 사진. c. 건조된 실크 피브로인 사진.

실크 피브로인 정련단계에 있어서, 1차년도에는 증류수 1L에 Sodium oleate 3g, sodium carbonate 2g을 녹인 용액에 누에고치 40g을 넣어 105℃에서 1시간동안 가열하여 실크피브로인을 얻을 수 있었다. 1차년도에 확립한 정련공정을 대량화하고 공정에 최적화하기 위해 2차년도에는 계면활성제를 사용하지 않고 증류수만을 사용하여 정련하는 방법을 도입하게 되었다. 증류수 18L에 누에고치 900g을 넣고 100℃에서 2시간동안 가열하여 실크피브로인을 얻을 수 있었다. 증류수만을 사용하여 정련했을 때 세리신이 완전히 제거되었는지 확인하기 위해 계면활성제를 사용하여 정련했을 때와 증류수 단독으로 정련했을 때의 평균 연감율을 비교해봤을 때 각각 29.03%와 29.01%로 거의 유사한 연감율을 보였고, 이를 통해 증류수 단독으로도 충분히 세리신을 제거할 수 있는 것을 확인하였다.

또한, 계면활성제 없이 증류수로 정련을 할 경우 제거된 세리신을 정련폐액으로 버리지 않고 다시 회수가 가능하다. 증류수 단독으로 누에고치를 정련한 후 실크피브로인을 건져내고 남은 액체를 miracloth로 필터하고 3,000rpm에서 5분간 원심분리하여 얻어진 상층액을 -70℃에서 냉동한 후 동결건조기를 이용하여 건조하여 세리신을 회수하였다. 이렇게 얻어진 세리신의 구조는 시중에 판매되는 세리신을 구입하여 FT-IR을 통해 비교분석하였다. FT-IR 분석 후 프로그램에서 제공되는 라이브러리서치 결과를 통해 실험을 통해 회수한 세리신과 시판되는 세리신이 동일한 물질임을 확인하였다.

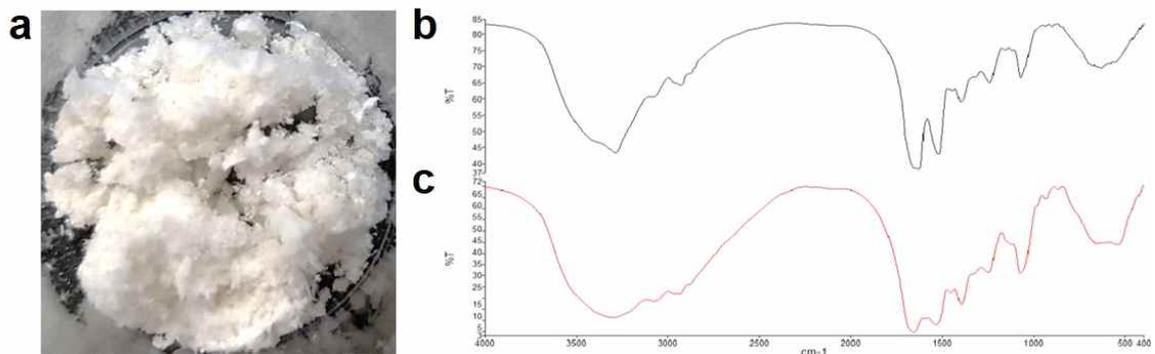


그림 12. a. 증류수 정련 후 회수한 세리신 사진. b. 실험을 통해 회수한 세리신의 FTIR Spectrum. c. 시판되고 있는 세리신의 FTIR Spectrum.

실크 피브로인의 정련공정에 있어서, 계면활성제를 첨가하는 단계를 생략하여 대량생산의 효율을 높였으며 추가적으로 정련 후 세리신을 회수하여 판매(시판가 kg당 8-9만원)할 수 있는 가능성을 확보하였다.

(나) 용해 및 가수분해 공정 최적화

실크 피브로인 용해단계에 있어서, 1차년도에는 실크 피브로인과 용매 비율을 0.2g/ml로 하여 9M Li염류에 실크 피브로인을 넣고 80℃에서 1시간동안 교반하여 실크 피브로인을 용해하였다. 이 방법은 공개되어있는 다른 용해방법(Calcium chloride+ethanol+H₂O - 3일(효소분해에 의한 실크분말 펩타이드의 제조방법-농촌진흥청), HCl+H₂O - 3일(실크아미노산의 생산방법-(주)월드웨이))에 비해 용해시간을 크게 단축할 수 있는 장점이 있지만 Li염류의 가격이 비교적 고가이므로 대량생산을 할 경우 비용적인 문제가 발생한다. 공정 최적화 연구에서는 실크 피브로인 용해에 대한 scale up과 공정화의 효율을 높이고자 용해액으로 Ca염류를 사용하였다. 증류수에 Ca염류를 50% 비율로 녹인 후 실크 피브로인과 50% Ca염류용액의 농도를 0.05g/ml로 하여 110℃에서 1시간동안 교반하여 용해하였다. Li염류를 용해액으로 사용했을 때와 Ca염류를 용해액으로 사용했을

때 용해에 소요되는 시간은 비슷하지만, 실크 피브로인 10g을 용해한다고 가정하여 사용되는 원재료가격을 계산해보았을 때 Li염류를 사용했을 때가 약 ₩6,400~9,000원, Ca염류를 사용했을 때가 약 ₩1,000~2,400원으로 Ca염류가 약 5배 정도 원가가 저렴한 것을 확인하였다.

a	사용 물질	Li염류	H ₂ O	b	사용 물질	Ca염류	H ₂ O
	시중판매가	₩80,000~90,000/500 g	-		시중판매가	₩10,000~20,000/kg	-
	1g 당 원재료가격	₩160~180	-		1g 당 원재료가격	₩10~20	-
	사용량	40~50 g	50ml		사용량	100~120 g	100ml
	원재료 가격	₩6,400~9,000	-		원재료 가격	₩1,000~2,400	-
	원 가	₩6,400~9,000			원 가	₩1,000~2,400	



그림 13. 실크 피브로인 10g 용해에 소요되는 원재료 가격 a. Li염류를 사용했을때의 원가. b. Ca염류를 사용했을 때의 원가

실크 피브로인의 용해공정에 있어서, 용해시약변경을 통해 용해효율은 유지하고 제조 원가는 20%이상 절감할 수 있었다. 이를 통해 실크 피브로인을 대량생산했을 때의 비용적 문제를 개선하고 사업성을 높일 수 있었다.

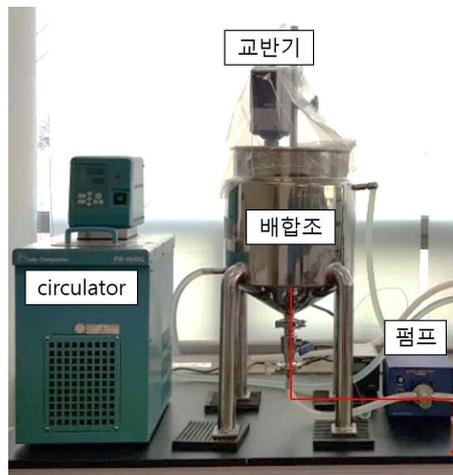


그림 14. 배합조 설비 사진

실크 피브로인 정련공정을 거친 후 습형태의 실크 피브로인을 용액상으로 만들기 위해 실크 피브로인을 용해하고 가수분해하는 공정이 필요하다. Lab scale의 실험에서는 용해 및 가수분해 공정을 실험용 초자와 가열교반기를 이용하여 진행하였다. 이러한 과정의 대량화를 위해 그림14와 같은 설비를 구축하였다. 그림 14에 나타나있는 배합조는 water jacket형태로 배합조 좌측의 circulator를 통해 온도 조절이 가능하다. 본 설비를 이용하여 배합조 상단에 정련된 실크피브로인과 Ca염류의 용해액을 넣은 후 교반기로 교반하여 실크 피브로인 용해액을 제조하였다. 약 1시간의 교반 후 모든 실크 피브로인이 용해되면, 강염기 시약을 넣어 약 20분간 교반하며 가수분해를 실시하였다. 모든 반응이 끝난 후 얻어진 실크 피브로인 용액은 그림에 나타나있는 빨간색 화살표와 같이 배합조 하단의 호스와 펌프를 통해 유량을 조절하여 쉽게 비커로 옮겨 담을 수 있었다.

배합조 설비 도입을 통해 한번에 용해 및 가수분해 할 수 있는 양이 약 2 L에서 20 L로 10배 가량 증가 하여 성공적으로 공정을 대량화 할 수 있었다.

(다) 염 제거 공정 최적화

실크 피브로인 용해 및 가수분해공정을 거친 후 실크 피브로인에 함께 용해되어 있는 다량의 염을 제거하기 위한 공정이 꼭 필요하다. 과년도 과제에서는 12~14kDa molecular cut off 셀룰로오스 아세테이트 막을 이용하여 약 3~4일 정도 흐르는 증류수에 투석하여 염을 제거하였다. 하지만 이러한 방법의 염 제거 과정은 실크 피브로인 제조 공정 전체에서 가장 많은 시간과 비용이 소모되었다. 따라서 당해연도 연구에서는 전기투석 장비를 도입하여 염 제거 과정에 소요되는 시간과 비용을 줄이고자 하였다.

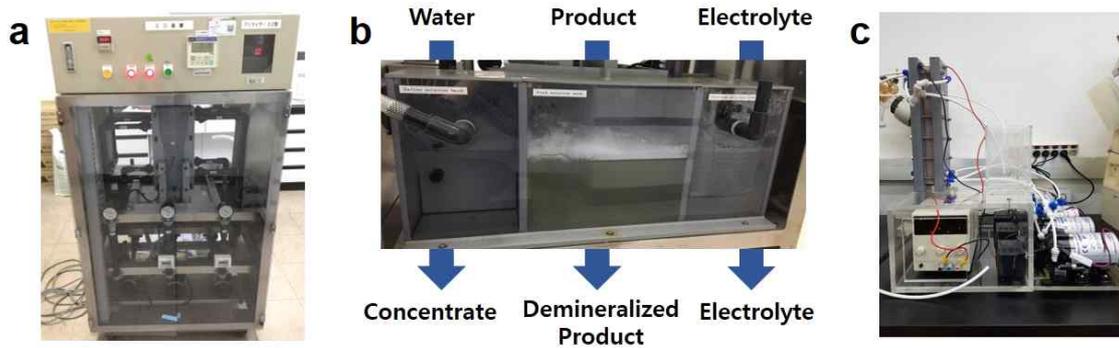


그림 15. 전기투석 설비 사진 a. 20L 규모의 전기투석기(대구가톨릭대학교 장비) b. 전기투석 사진 (대구가톨릭대학교 장비) c. 과제를 통해 구입한 전기투석기 설비 사진

전기투석 장비는 양이온 교환막과 음이온 교환막을 통한 이온의 선택적인 전기적 이동에 의해 용액속의 염이 제거된다. 용액속에 포함된 염의 농도는 이온전도도측정기로 확인했으며, 용해공정을 마친 직후에 용액의 이온전도도는 157.7ms/cm였으며 전기투석을 했을 경우 약 8시간 후 이온전도도가 약 1ms/cm로 빠르게 떨어졌으며, 투석막을 이용했을 경우 약 24시간 후 이온전도도가 약 1ms/cm가 되었다. 각각의 투석과정은 증류수의 이온전도도인 30 μ s/cm와 유사해질 때까지 진행되었으며 전기투석기를 이용했을 경우에는 약 2일, 투석막을 이용했을 경우에는 약 5일이 소요되었다.

전기투석 설비를 도입함으로써 실크 피브로인 제조 공정 중 가장 오랜 시간이 소요되는 염 제거 과정에서의 소요시간을 크게 단축하고 한 번에 투석할 수 있는 양도 증가하여 전체 공정의 효율이 크게 향상되었다.

(라) 건조 공정 최적화



그림 16. 과제를 통해 구입한 동결건조기 설비 사진

실크 피브로인 제조공정 중 용해공정과 염제거 공정을 거친 후 실크 피브로인 수용액은 투명한 용액상태로 존재하지만, 시간이 지나면 외부의 응력, 온도등의 요소에 의해 단백질 2차 구조의 변형이 촉진되어 베타시트 구조를 형성하여 쉽게 겔화되는 문제점이 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 동결건조 설비를 도입하고 용액상의 실크 피브로인을 -70°C 의 저온에서 얼린 후 동결건조하여 파우더 형태로 보관하는 방법에 대해 연구하였다. 실크 피브로인 용해액은 비가역적으로 동결건조후에 다시 물에 재용해되지 않는다. 이러한 문제점을 개선하기 위해 실크 피브로인 용액 가수분해 방법을 적용하였다. 실크 피브로인 용액의 농도가 0.1M이 되도록 1M 강염기류를 첨가한 후 80°C 에서 20분간 가열하여 가수분해처리를 하였다. 가수분해처리를 마친 실크 피브로인 용액은 miracloth로 필터 한 뒤 전기투석기로 2일 이상 충분히 투석하여 염을 제거하였다. 염이 제거된 실크 피브로인 용액은 3,000rpm에서 5분간 원심분리하여 얻어진 상층액을 -70°C 에서 냉동한 후 동결건조기를 이용하여 건조하여 수용성 실크 피브로인 파우더를 제조하였다.

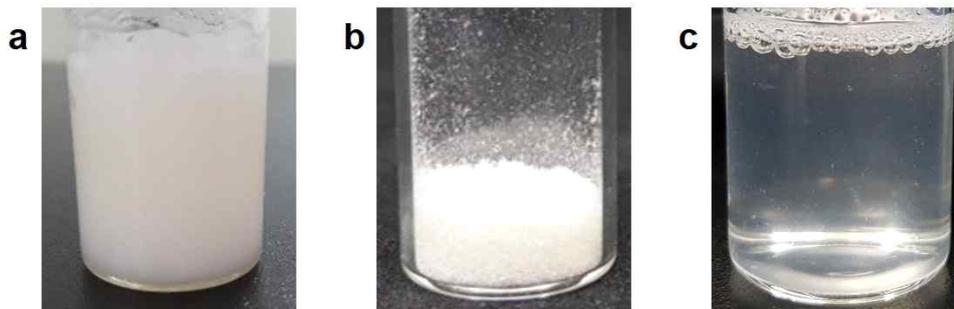


그림 17. a. 용액상 실크 피브로인이 겔화 된 사진. b. 동결건조한 실크 피브로인 파우더 사진. c. 실크 피브로인 파우더를 증류수에 재용해 한 사진

용액상의 실크 피브로인이 최장 2주 정도밖에 보관안정성을 가지는 것에 비해 동결건조하여 얻어진 실크 피브로인 파우더는 몇 달이상의 보관안정성을 갖는다. 이렇게 장기간 보관안정성을 갖는 실크 피브로인 파우더는 사용시 증류수나 PBS에 필요농도만큼 용해하여 사용할 수 있으므로 용액상으로 보관할때에 비해 농도조절이 쉬운 장점이 있다.

동결건조 설비를 도입하여 실크 피브로인을 파우더화 함으로써, 1~2주밖에 보관할 수 없어 사용상 가장 큰 문제가 되었던 보관안정성의 문제를 해결할 수 있었다.

(4) 대량 생산 실크 피브로인 특성 평가
 (가) 실크 피브로인 파우더의 입자크기

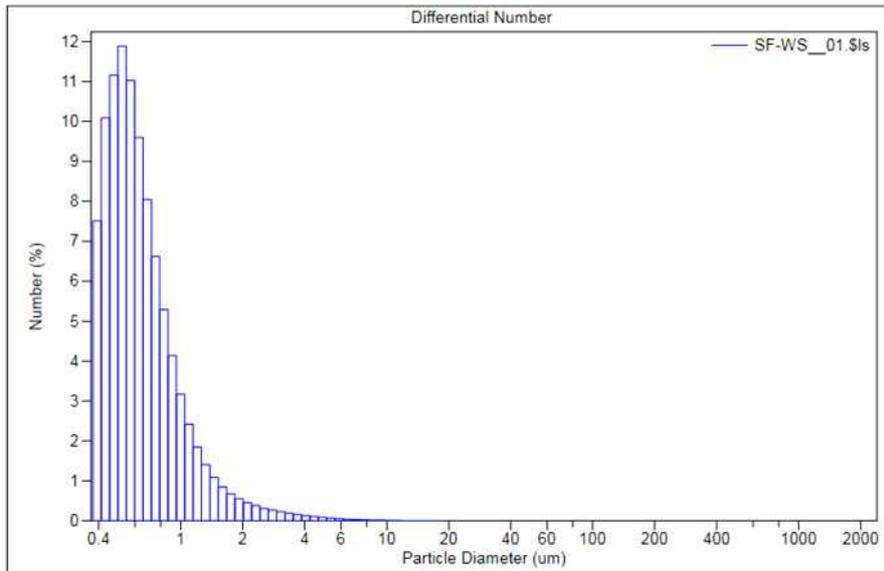


그림 18. 실크 피브로인 파우더 입자크기 분석

장기 보관안정성을 위해 동결건조하여 파우더화 한 실크 피브로인의 입자크기를 측정하기 위해, 0.375 μm ~ 2000 μm 범위의 입자 분포를 분석하였다. 그 결과 대량 생산한 실크 피브로인의 입자 크기는 10 μm 이내로 매우 작은 입자 사이즈를 가지고 있었다.

(나) 실크 피브로인 파우더의 보관안정성 평가

실크 피브로인의 보관안정성을 비교평가하기 위해 1)가수분해를 하지 않은 실크 피브로인, 2)가수분해 한 수용액상태의 실크 피브로인, 3)가수분해 후 동결건조한 실크 피브로인 3종류의 실크 피브로인을 사용하여 각각 4°C, 25°C, 60°C에서 2주, 5주, 8주, 16주간 방치 후 상태 변화를 관찰하였다. 1)가수분해 실크 피브로인 1 ml를 각각의 온도조건에서 기간별로 방치했으며, 2) 가수분해 한 수용액 실크 피브로인은 실크피브로인 파우더 1 g을 증류수 1 ml에 녹인 후 각각의 온도조건에서 기간별로 방치했으며, 3) 가수분해 후 동결건조한 실크피브로인은 실크피브로인 파우더 1 g을 바이알에 담아 파우더 형태로 기간별로 방치 후 일정 기간이 지난 후 증류수 1 ml에 녹여 그 상태를 확인하였다.

		2 w	5 w	8 w	16 w
SF 가수분해 x	4°C				
	25°C				
	60°C				
SF 가수분해 수용액	4°C				
	25°C				
	60°C				
SF 가수분해 파우더 보관 후 재용해	4°C				
	25°C				
	60°C				

그림 19. 실크 피브로인 보관안정성 평가(2주, 5주, 8주, 16주)

가수분해를 하지 않은 실크 피브로인은 상온과 60°C에서 2주 이내에 젤을 형성하였고 4°C에서도 5주 이내에 젤을 형성하였으며 시간이 지날수록 심하게 변성되었다. 가수분해를 한 실크 피브로인을 10% 농도로 재용해하여 액체상태의 보관안정성을 관찰하였을 때, 4°C에서는 8주까지 우수한 보관안정성을 보였으나 그 후에 약간의 황변현상을 보였고, 25°C와 60°C에서는 2주 이내에 변성이 일어나 약간의 황변현상과 냄새가 발생하였으며, 가수분해를 하지 않은 실크 피브로인과 마찬가지로 시간이 지날수록 심하게 변성되었다. 가수분해한 실크 피브로인을 동결건조하여 파우더 상태로 보관한 뒤 일정 시간이(2주, 5주, 8주, 16주) 지난 뒤 증류수에 재용해 했을 때, 16주 이상까지 냄새나 색의 변화가 없고 원래의 상태를 잘 유지하는 것을 확인 할 수 있었다. 이를 통해 실크 피브로인의 가장 좋은 보관온도는 냉장보관인 것을 알 수 있었으며, 파우더 상태로는 4달 이상 보관하여도 변성이 없는 것을 확일 할 수 있었다.

나. 실크 피브로인 함유 복합 바이오잉크 제조 및 특성평가

(1) 바이오잉크용 광중합 고분자(GelMA) 제조

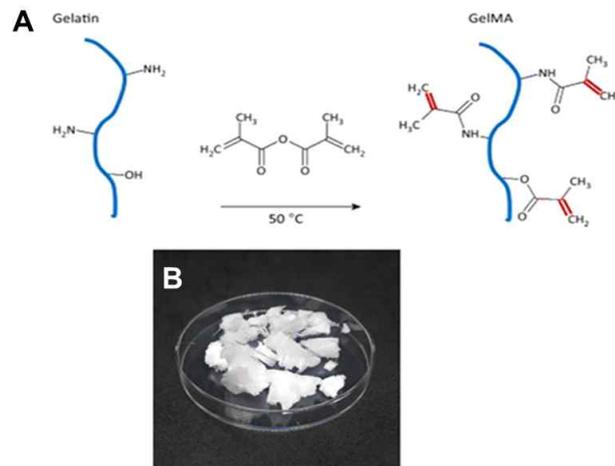


그림 20. (A) 젤라틴과 Methacrylic anhydride 반응에 의한 Gelatin Methacrylamide(GelMA) 합성 모식도. (B) 합성 후 동결 건조시켜 얻은 GelMA 파우더의 사진.

본 연구에서 사용된 젤라틴 메타크릴아마이드(Gelatin Methacrylamide, 이하 GelMA)는 젤라틴과 Methacrylic anhydride를 반응시켜 합성하였으며, 그림 20A에 모식도로 나타내었다. 젤라틴과 반응시킴으로써 젤라틴 단백질 서열 내부의 라이신이 갖고 있는 아민기를 메타아크릴아마이드기로 개질시킨다. 이를 통해 얻은 GelMA는 광가교반응을 통해 하이드로젤을 형성할 수 있다.

젤라틴 치환률을 높이기 위해서 카보네이트 버퍼상에서 반응을 진행하였으며 그 구체적인 방법은 다음과 같다. 증류수 1L에 Sodium Carbonate 7.95g, Sodium Bicarbonate 14.65g를 50°C에서 1시간 동안 충분히 녹여 카보네이트 버퍼 용액을 만든다. 이후 버퍼 용액의 pH가 9에 도달한 것을 확인하고, Gelatin (이하 젤라틴) 100g을 투입하여 50°C에서 2시간 이상 녹인다. 이 때 젤라틴이 빠르게 녹을 수 있도록 500 RPM 이상으로 격렬히 교반한다. 젤라틴/카보네이트 버퍼 용액이 만들어지면, Methacryl anhydride 10 ml를 투입하고 50°C에서 2시간 동안 젤라틴과 반응시켜 GelMA를 합성한다. 이후 GelMA 용액을 동결 건조하여 GelMA 파우더를 얻어 실험에 이용하였다 (그림20B).

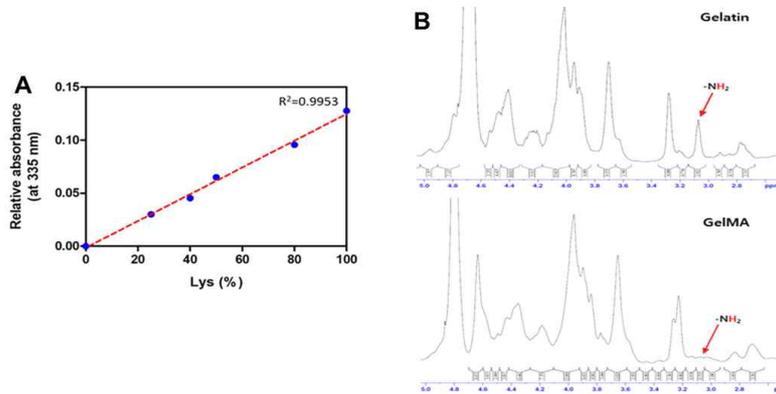


그림 21. 합성된 GelMA의 치환도 평가 방법. (A) TNBSA assay에 쓰인 Standard Curve, (B) 젤라틴과 GelMA의 ¹H-NMR 측정 결과

합성한 GelMA의 치환도는 두 가지 방법을 통해 계산하였다. 첫 번째로 TNBSA assay를 이용하여 라이신에 존재하는 아미노기가 Methacrylamide 그룹으로 치환된 백분율을 조사하였다(그림21A). TNBSA assay는 TNBSA (2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid)가 1차 아민과 빠르고 민감하게 반응하여 흡광도가 변하는 성질을 이용한 것이다. 측정 프로토콜은 Thermo Scientific사(미국)에서 제공하는 것을 사용하였다. 측정 결과 젤라틴 메타크릴아마이드의 흡광도는 약 0.0063으로 나타내었으며, 이 값과 Standard Curve를 이용해 계산하면, 반응하지 않고 남아 있는 라이신의 양이 약 1.67%임을 알 수 있다. 따라서 젤라틴 메타크릴아마이드의 치환도는 약 98.33%이었다. 두 번째 방법으로 ¹H-NMR을 이용하여 라이신의 아미노기 치환도를 조사하였다(그림21B). 젤라틴이 GelMA로 합성되면, 반응에 참여한 라이신이 나타내는 NMR peak(3.1 ppm)의 크기가 줄어든다. 반응 전후 라이신 peak에 해당하는 적분값을 계산하여, peak이 얼마나 줄어들었는지 비율을 계산하면 치환도를 계산하였다.

$$\text{치환도} = \frac{\int_{\text{Gelatin Lys}} - \int_{\text{GelMA Lys}}}{\int_{\text{Gelatin Lys}}} \times 100 (\%)$$

측정된 값에 따르면 젤라틴에서 나타나는 라이신 peak의 크기를 1로 하였을 때, GelMA에서 나타나는 라이신 peak의 상대적 크기는 약 0.017로 계산된다. 따라서 치환도는 약 98.3%로 계산된다. 두 가지 방법을 통해 계산한 치환도가 약 98.3%로 유사하고, 치환도 값 또한 95% 이상의 값을 보이므로, GelMA가 잘 합성되었음을 확인하였다.

(2) GelMA 대량생산 공정화

1,2차년도에 실크 피브로인 제조 공정을 대량화 하였으며, 3차년도에는 실크 피브로인과 혼합하여 바이오잉크를 만드는 베이스 물질인 GelMA의 제조 공정을 개선하여 대용량 바이오잉크를 제조하고자 하였다.

GelMA의 제조단계에 있어서, 기존에는 증류수 1L에 Sodium Carbonate 7.95g, Sodium Bicarbonate 14.65g를 50°C에서 녹여 카보네이트 버퍼 용액을 만든 후 젤라틴 100g을 투입하여 완전히 용해되면 Methacryl anhydride 10 ml를 투입하고 50°C에서 2시간 동안 교반하여 GelMA

를 합성한다. 합성한 GelMA는 과량의 Methacryl anhydride와 Sodium carbonate, sodium bicarbonate를 제거하기위해 50℃에서 일주일 이상 투석한다. 투석후 불순물을 제거한 GelMA를 동결건조하여 최종적으로 GelMA 파우더를 제조할 수 있다. 확립한 공정을 간략화하고 대량화하기위해 반응단계중 가장 긴 시간이 소요되는 투석공정을 새로운 공정방법으로 대체하였다. 새로운 공정방법으로 1회 생산 가능량을 최소 10배 이상 늘렸으며, 공정 소요시간을 2주 이상 감소시키고 원가도 기존의 20%정도로 대폭 감소시킬 수 있었다.

분류	개선 전	개선 후
불순물 제거 소요시간	약 1~2주	3시간 이내
동결건조 소요시간	약 1~2주	약 2일
1회 제조 용량	약 100 g	1 kg 이상
제조 원가 (100 g)	₩100,000~150,000	₩30,000~50,000

그림 22. GelMA 제조 공정 개선

또한, 개선전 공정에서는 GelMA 용액을 동결건조하여 스펀지 형태의 최종 결과물을 얻을 수 있었지만, 개선된 공정에서는 불순물을 제거한 GelMA를 고체형태로 얻어 건조 후 파쇄하여 결정형태의 제품을 얻을 수 있었다. 유사한 부피의 GelMA 무게를 측정하였을 때 기존공정으로 얻은 스펀지 형태는 약 0.5 g이고, 신규 공정을 적용한 결정형태의 GelMA는 약 15 g으로 약 30배 밀도가 증가하였다. 기존의 스펀지형태제품의 낮은 밀도와 무게 측정시 정전기가 많이 발생하는 단점을 극복하여 이용자의 사용 편의성을 높일 수 있었다.



그림 23. 신규공정이 적용된 GelMA 제품 밀도 비교(기존공정 0.5 g, 신규공정 15 g)

(3) GelMA/가수분해 실크피브로인(SF-WS) 함유 복합 바이오잉크 제조 및 특성평가

(가) GelMA/SF-WS 함유 복합 바이오잉크 전구 용액 제조 및 DLP 적용가능성 평가

SF-WS 함유 복합 바이오잉크 전구용액 제조를 위해 광중합 고분자 물질 (GelMA)에 SF-WS 1%, 5%, 10%를 혼합하여 전구용액을 제조하고 그 특성을 평가하였다.

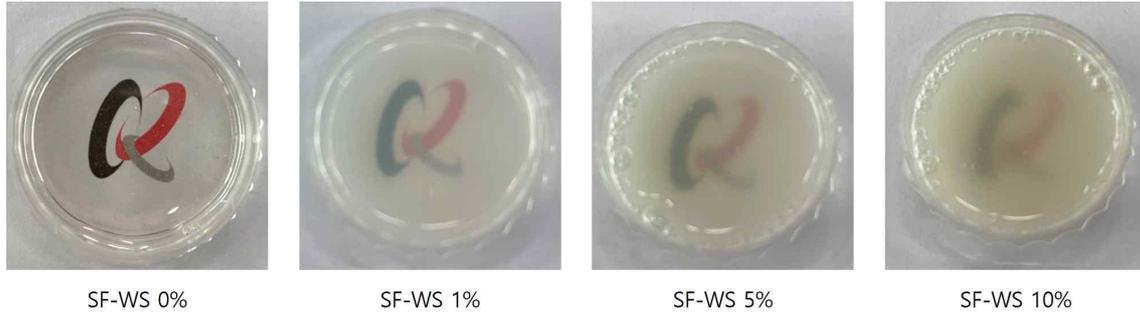


그림 24. SF-WS 농도에 따른 복합 바이오잉크 전구 용액 비교사진

GelMA에 SF-WS 파우더를 1%, 5%, 10% 혼합한 바이오잉크 전구 용액을 육안으로 관찰하였을 때, 그림 24와 같이 가수분해 실크피브로인의 함량이 높아질수록 용액의 투명도가 감소하고 용액이 탁해지는 현상이 발생하였다.

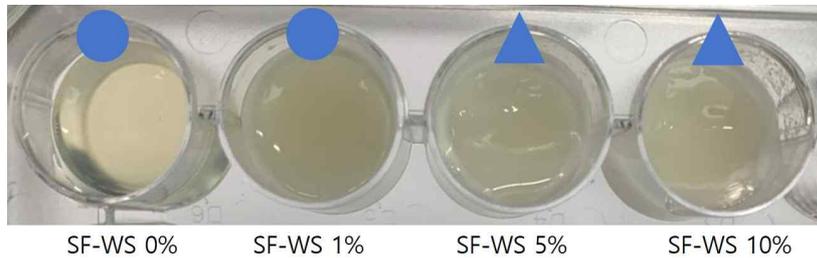


그림 25. 가수분해 실크피브로인 농도에 따른 바이오잉크 전구 용액 젤화 평가

실크피브로인의 농도에 따른 젤화 정도를 평가하기 위해 바이오잉크 전구 용액에 25W UV lamp로 1분간 빛을 조사하여 육안으로 젤화 정도를 관찰하였다. 그림 25에서 보이는 바와 같이 SF를 1% 혼합하였을 때는 SF를 첨가하지 않았을 때와 유사하게 젤을 잘 형성하였으며, SF의 농도가 높아질수록 GelMA의 광가교를 방해하여 젤 형성이 약해졌다.

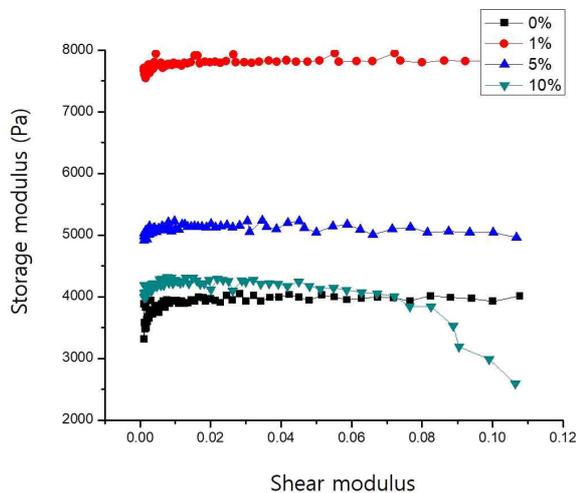


그림 26. 가수분해 실크피브로인 농도에 따른 하이드로젤 점도 비교

실크피브로인의 농도에 따른 젤의 점도를 비교하기 위해 각각의 전구용액을 두께 2 mm의 몰드에서 젤화 한 뒤 지름 8 mm의 바이오피 펀치로 잘라 rheometer 측정을 위한 샘플을 준비하였다. rheometer로 하이드로젤의 점도를 측정해본 결과 GelMA 단독 하이드로젤의 점도는 약 3500Pa이고, SF를 1% 혼합한 하이드로젤은 7500 Pa로 점도가 크게 향상되는 것을 알 수 있었다. SF 5%와 10%를 혼합하였을 때는 GelMA 단독 하이드로젤과 점도가 크게 차이 나지 않았다. SF이 1%정도 첨가되었을 때는 GelMA의 물성보강제로 작용하지만, 그 이상 농도가 높아지면 광가교를 방해하여 물성강화에 큰 영향을 주지 못하는 것으로 생각된다.

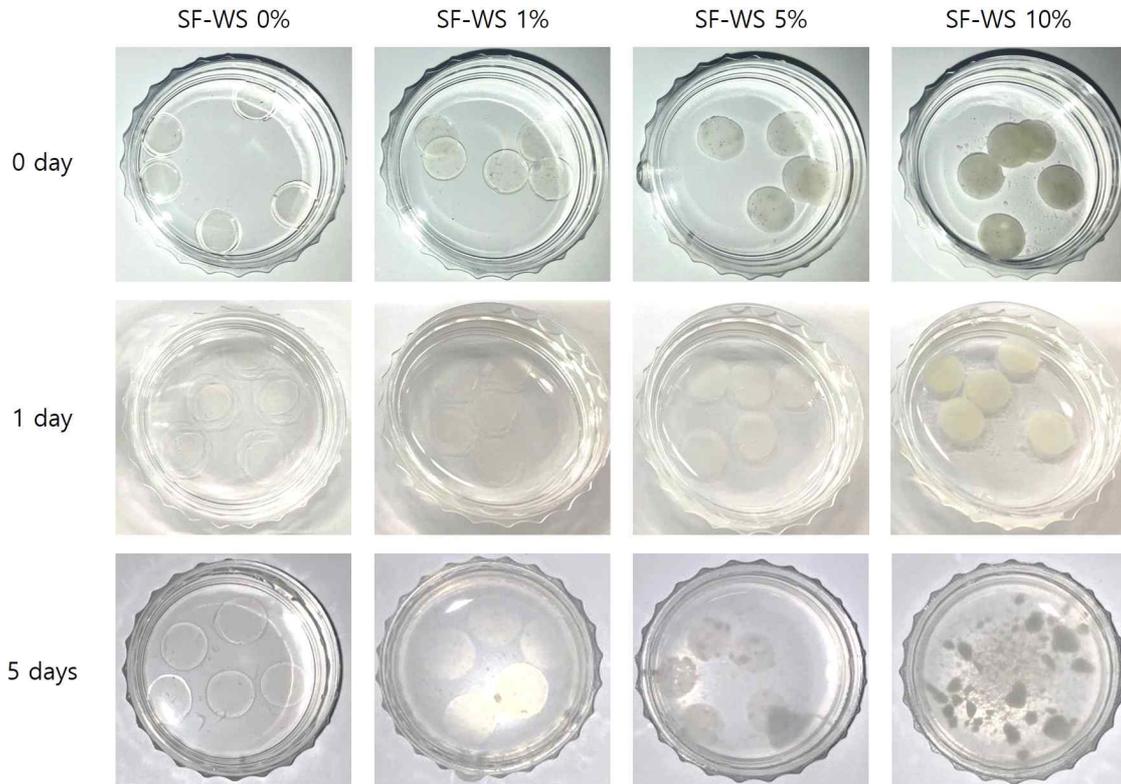


그림 27. SF 함량에 따른 하이드로젤 구조체 유지정도 평가

실크피브로인 함량에 따른 하이드로젤 구조체 유지정도를 평가하기 위해 SF 0%, 1%, 5%, 10% 하이드로젤을 두께 2 mm, 지름 8 mm로 준비하였다. 샘플에 PBS 1 ml를 넣은 후 37°C에서 보관하여 5일간 그 변화를 관찰하였다. SF 0%와 1%는 5일동안 그 형태를 잘 유지하였으며, SF 5%는 5일 뒤 SF가 PBS에 빠져나와 젤의 형태가 약간 흐려졌다. SF 10%는 5일 뒤 SF가 PBS에 빠져나오며 젤의 형태가 완전히 분해되었다.

상기 실험을 통해 복합 바이오잉크 전구 용액의 실크피브로인 적정 혼합비는 1% 인 것으로 판단된다.

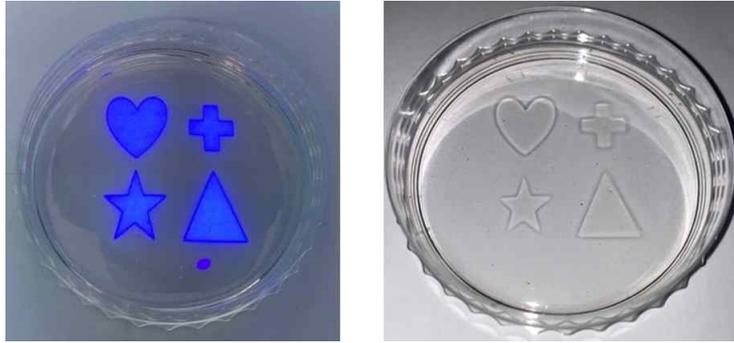


그림 28. GelMA/SF-WS 함유 복합 바이오잉크 DLP프린팅

GelMA/SF-WS 1% 혼합 용액에 405 nm UV 빔프로젝터를 이용하여 그림 28과 같이 다양한 디자인의 구조체를 용이하게 제조할 수 있었다.

(나) GelMA/SF-WS 함유 복합 바이오잉크 세포독성 평가

대량생산한 GelMA에 1%실크피브로인 파우더를 혼합하여 제조한 하이드로젤의 생물학적 안전성을 평가하기 위해 경북 테크노 파크에서 국제시험규격인 ISO 10993-5:2009 “Annex C MTT cytotoxicity test” 를 따르는 방법으로 시험평가를 의뢰하였다. 시험물질인 GelMA/실크피브로인 복합 하이드로젤을 0.1 g/ml 농도로 37°C에서 하루동안 용출시켜 용출물을 12.5%, 25%, 50%, 100%농도로 희석하여 농도에 따른 세포독성을 평가하였다. 100%농도에서 세포생존을 70% 이상일 경우 세포독성이 없는 것으로 판단하며, GelMA/실크 피브로인 복합하이드로젤의 경우 94.9%로 세포독성이 없는 것으로 판단되었다.

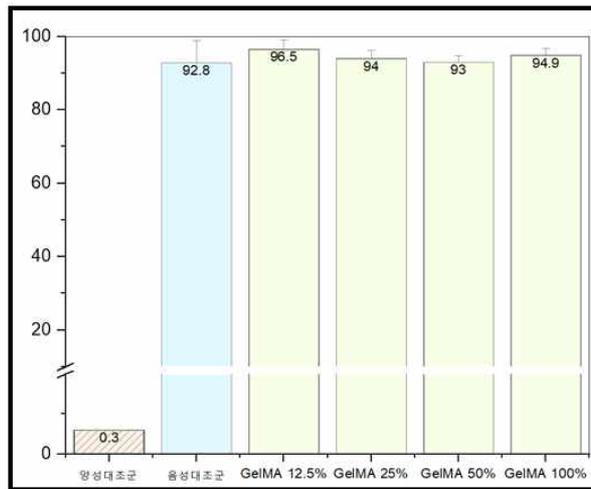


그림 29. 대량생산 바이오잉크의 용출물 농도에 따른 MTT assay

시험 성적서

 93042 경상북도 경산시 영촌면 송구별과 18 (Tel: 053-819-8120, Fax: 053-819-8118)	시험성적서번호 : 18-030802 페이지 (1) / (총 3)							
1. 의뢰자 * 기관명 : ㈜국동중앙연구소 * 주소 : 부산시 사하구 하신번영로 135, 3층 2. 시험대상 품목/물질/시료 설명 : G 3. 시험기간 : 2018년 10월 29일 ~ 2018년 11월 07일 4. 시험방법 : ISO 10993-5:2009, Annex C MTT cytotoxicity test 5. 시험결과 :								
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 33%;">시험항목</th> <th style="width: 33%;">시료명</th> <th style="width: 33%;">시험결과*</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">세포독성</td> <td style="text-align: center;">G</td> <td style="text-align: center;">음성, (94.9 ± 1.8) %</td> </tr> </tbody> </table>			시험항목	시료명	시험결과*	세포독성	G	음성, (94.9 ± 1.8) %
시험항목	시료명	시험결과*						
세포독성	G	음성, (94.9 ± 1.8) %						
* 시험물질 100% 용출물에 대한 세포생존율(n = 6)								
								
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 10%;">확인</td> <td style="width: 40%;">작성자 성명 : 박정호 </td> <td style="width: 50%;">기술책임자 성명 : 안재진 </td> </tr> </table>			확인	작성자 성명 : 박정호 	기술책임자 성명 : 안재진 			
확인	작성자 성명 : 박정호 	기술책임자 성명 : 안재진 						
1. 이 시험성적서는 의뢰자가 제시한 시료 및 시료명으로 시험한 결과로서 전체 제품에 대한 품질을 보증하지는 않습니다. 2. 이 시험성적서는 당 기관의 사전 서면 동의 없이 홍보, 선전, 광고 및 소송용으로 사용될 수 없으며, 몰도 이외의 사용을 금합니다. 3. 당 기관의 직인이 없는 경우에는 시험성적서의 효력이 없습니다.								
2018년 11월 14일 (재)경북테크노파크 원장  (인)								
GBTP-KQP-24-F02	(재)경북테크노파크	A4(210 X 297)						

그림 30. 대량생산 바이오잉크의 세포독성평가 시험성적서

(4) GelMA/실크 피브로인 입자 함유 복합 바이오잉크 제조 및 특성 평가

(가) GelMA/실크 피브로인 입자 함유 바이오잉크 전구용액 제조

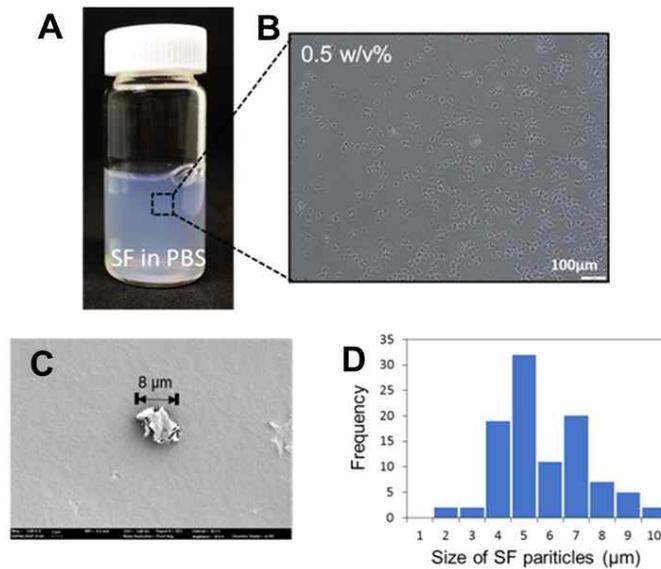


그림 31. 실크 피브로인 입자의 수용액 분산성. (A) 0.5 wt% 실크 피브로인 입자 용액의 사진, (B) 실크 피브로인 용액의 광학현미경 이미지, (C) 실크 피브로인 입자의 전자현미경 사진 (D) 실크 피브로인 입자의 크기 분포.

실크 피브로인 입자 분산액은 정제 완료된 실크 피브로인 용액에 Tip sonicator를 이용하여 전 단력을 가해 젤화시켜 주었다. 이후 Homogenizer를 사용하여 젤을 잘게 분쇄하였다. Homogenize 과정은 10,000 RPM으로 30 초 동안 진행하였다. 이후 10 분간 Tip sonication을 가하였고, 이 후 얻은 용액을 3000 RPM으로 원심분리하여 상등액만을 취하여 실험에 사용하였다. 용액 내에서 입자가 잘 분산되어 있는 것을 광학 현미경으로 확인하였으며, 입자는 20~50 µm 크기의 분포를 나타내었다 (그림31).

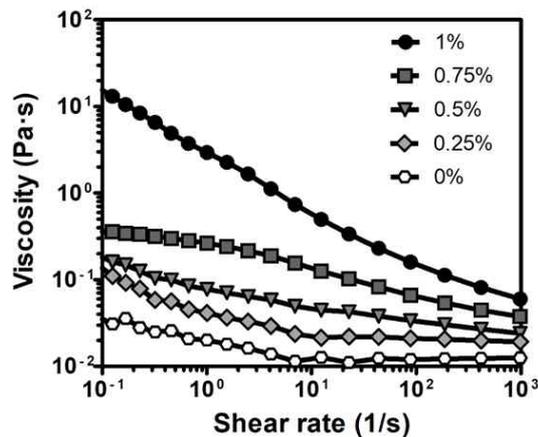


그림 32. GelMA와 실크 피브로인의 혼합비에 따른 전구 용액의 점도 변화

GelMA와 실크 피브로인의 혼합비에 따른 전구체 용액의 점도를 측정하기 위해 PBS를 용매로 사용하여 GelMA의 최종 농도를 10 wt%로 고정하였고, 입자화 시킨 실크 피브로인의 최종 농도를 각각 0, 0.25, 0.5, 0.75 그리고 1 wt%로 조절해 용액을 제조하였다. 점도 분석을 위해 MARSIII Rheometer (ThermoScientific, oscillation time-sweep mode with 5% strain, 1Hz, a gap size of 0.3 mm)를 사용하였으며, 0.3 mL의 전구체 용액을 수정판에 떨어뜨린 후 shear rate에 따른 점도를 측정하였다. 그 결과 그래프와 같이 실크 함량이 높아짐에 따라 전구체 용액의 점도가 증가하였다 (그림 32). 본 과제에서 잉크는 DLP방식의 3D 프린터용 바이오 잉크로 장시간의 프린터 환경에서 세포의 침전을 억제하여 세포가 잘 부유되어 있을 수 있는 점도조절제가 필요할 것으로 사료 되었으며, 실크 피브로인을 점도 조절제로 사용하고자 하였다.

(나) 실크 피브로인 입자 함유 바이오잉크의 DLP 방식 3D 프린팅 적용 가능성 평가

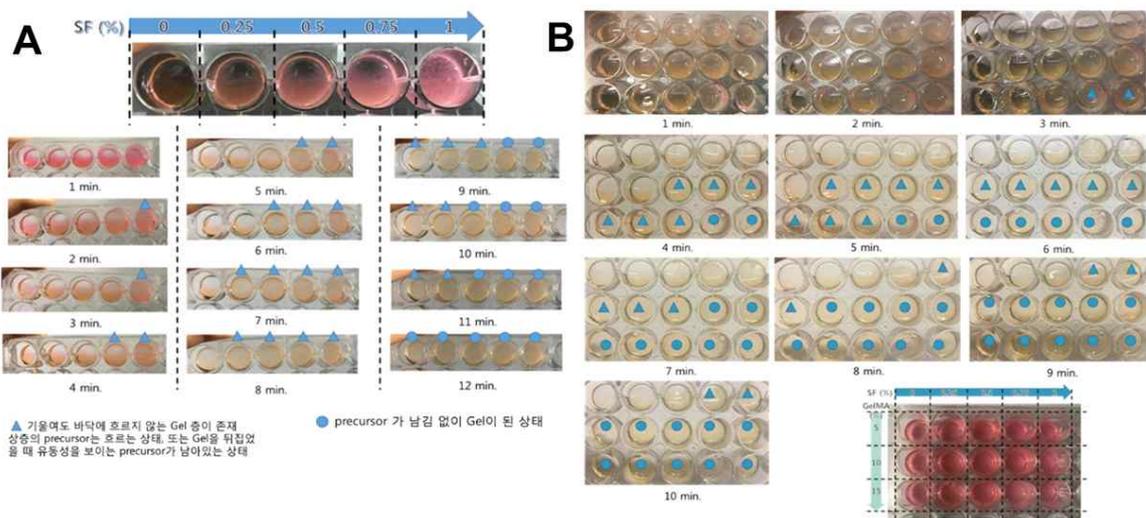


그림 33. SF 농도와 빔 조사 시간에 따른 젤화 평가 (A) 50,000 lux (B)100,000 lux.

본 연구에서는 가시광선 영역의 빔을 이용하여 젤화를 유도하고자 하였기 때문에 광원에서 만들어지는 UV 영역의 빔은 UV 필터를 장착하여 제거하였다. 광원으로 나온 가시광선 영역의 빔은 50,000과 100,000 lux로 빔 세기를 조절하여 최대 10분까지 1분마다 조사한 후 젤화 정도를 평가하였다. 5가지의 다른 SF 농도에 따른 혼합 전구체 용액의 젤화 거동에 있어서 SF 농도가 증가함에 따라 젤화가 용이하게 일어남을 알 수 있었다 (그림 33A).

일반적으로 빔 조사 시간이 증가함에 따라 전구체 용액의 젤화가 더 진행되는 경향을 보였다. 젤화는 동일한 빔 조사 시간에 있어서 SF 농도가 증가함에 따라 더 촉진이 되었으며, 최소 11분의 빔 조사가 있었을 경우 모든 SF 농도의 전구체 용액에서 젤화가 완전히 진행되었다. 1% SF 농도의 전구체 용액을 기준으로 하였을 경우에는 9분 이상의 빔 조사 조건에서 젤화가 완전히 진행되었다. 광원의 세기를 100,000 lux로 높였을 경우에는 4분동안의 빔 조사시에 15%의 GelMA에서 젤화 완료되었고, 10% GelMA의 경우에는 7분동안의 빔 조사에서 완전한 젤화가

관찰되었다 (그림 14B).

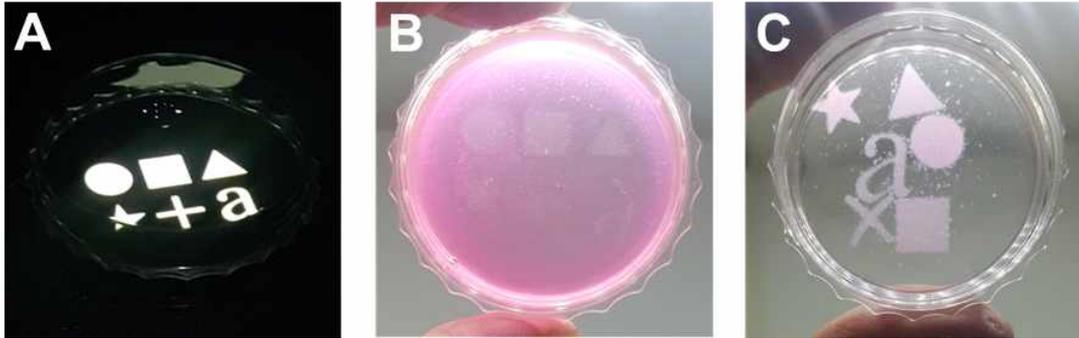


그림 34. DLP 3D 프린팅 시스템으로 제조된 하이드로젤 패턴. (A) 조사빔 패턴의 사진, (B) 바이오잉크에 조사된 빔 패턴 사진, (C) 세척 후 회수된 하이드로젤 패턴

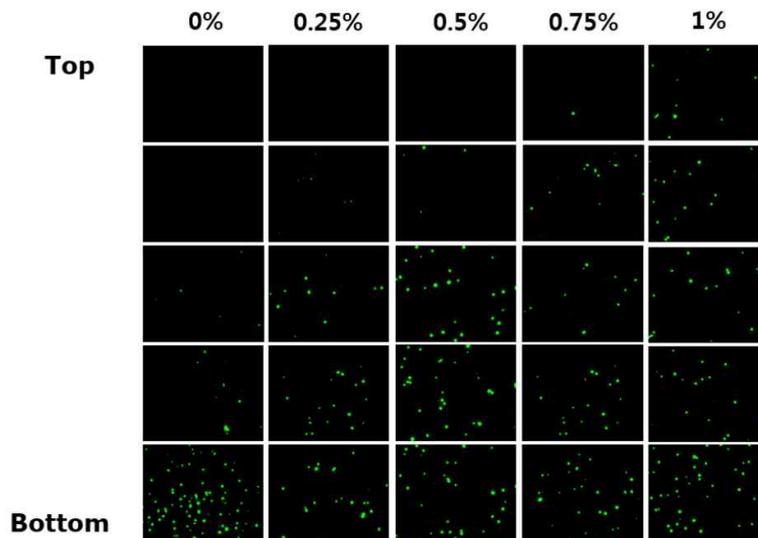


그림 35. GelMA와 실크 피브로인 혼합비에 따른 전구체 용액의 Z축 분할 형광현미경 이미지

그림 34에서 보이는 바와 같이 실크 피브로인 입자를 함유한 GelMA 바이오잉크를 이용하여 다양한 디자인의 하이드로젤 구조체를 용이하게 제조할 수 있었다. 그러나 DLP 방식 3D 프린팅의 경우 액상 용액에 세포가 일정 시간동안 안정적으로 분산되어야 하는 특성이 요구되었다. 특히 점도가 낮은 용액의 경우 빠르게 세포가 침전하는 현상이 발견되었으며, 결과적으로 세포가 고르게 분포된 하이드로젤 구조체를 얻는 것이 불가능하였다. 콜로이드 분산 안정성은 매질 및 입자의 밀도에 크게 좌우되는 것으로 알려져 있기 때문에, 본 연구에 있어서는 전구체 용액의 점도 증가를 통하여 세포의 분산 안정성이 확보될 수 있는지 확인하고자 하였다. 예비 실험을 통하여 실크 피브로인 입자의 첨가가 용액의 점도 특성을 변화시킬 수 있음을 알 수 있었도 이에 GelMA와 실크 피브로인 혼합비를 조절하여 다양한 점도의 전구체 용액을 제작하여

1 × 10⁶/mL의 NIH 3T3 cells을 첨가한 후 각 용액에서의 세포 분산도를 평가하였다. 용액 내의 세포의 분산 정도를 살펴보기 위해서 세포는 Calcein AM으로 형광 염색하여 각 전구체 용액에 균일하게 분산시킨 뒤 약 1시간 후 형광현미경을 통해 세포의 분포를 살펴보았다 (그림 35). 그 결과, 실크 피브로인의 농도가 증가할수록 용액 전체에 세포가 잘 분산되어 있음을 확인하였다. 특히 실크 피브로인을 넣지 않은 전구체 용액은 세포의 침전이 약 5분 안에 일어났으며, 실크 피브로인 1 wt% 농도의 전구체 용액은 약 1시간이 지나도 세포가 균질하게 섞여있는 것을 관찰 할 수 있었다. 이는 실크 피브로인이 함유됨에 따른 전구체 용액의 점도의 증가가 세포 분산도를 높이는데 효과적인 것으로 보이며, 실크 피브로인은 바이오잉크의 점도 조절제로서의 중요한 역할을 함을 확인하였다.

(다) 실크 피브로인 입자 함유 바이오잉크 및 하이드로젤의 세포 독성 평가

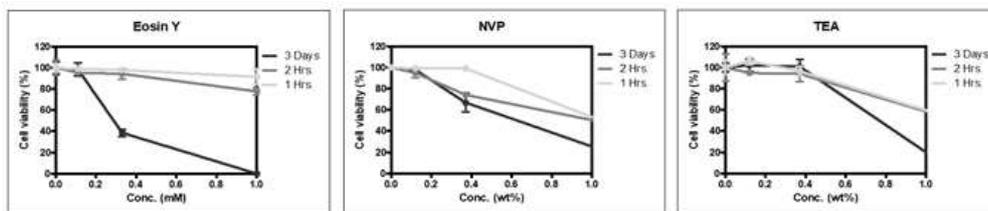


그림 36. 개시제(EosinY)와 조개시제(NVP와 TEA)의 시간 및 농도에 따른 세포 독성 평가

GelMA와 실크 피브로인 용액의 겔화를 위한 바이오 잉크 물질들의 조합비를 찾기 위해 먼저 1차 가교에 쓰이는 GelMA의 겔화 조건을 선정하고자 하였다. 예비 실험에서 EosinY의 농도 0.1mM 이내에서 GelMA의 겔화가 잘 진행된다는 것을 알아내었고, 추가 연구를 통해 개시제와 조개시제의 시간 및 농도에 따른 세포 독성 평가를 실시하여 세포 독성을 띠지 않는 농도의 범위를 설정하였다. 개시제인 Eosin Y의 경우 0.4mM내에서는 2시간 이내에는 세포 독성이 거의 없는 것으로 확인하였으며, NVP와 TEA의 경우에는 각각 0.2 wt%와 0.4 wt%로 2시간 이내에 세포에 처리하였을시 90%이상의 세포 생존률을 보임을 확인하였다 (그림 36).

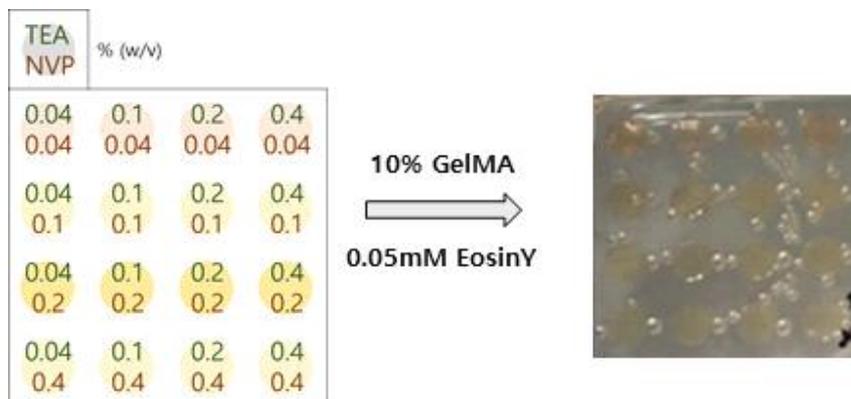


그림 37. NVP와 TEA의 농도에 따른 GelMA의 겔화 평가

따라서 세포 독성 평가를 기반으로 GelMA에 개시제와 조개시제의 농도를 다양하게 하여 겔화

를 진행함으로써 겔화가 잘 되는 최적의 물질 조합비를 찾아내었다. 표와 같이 GelMA는 10 wt%로 개시제인 EosinY는 0.05mM로 고정하여 조개시제인 TEA와 NVP 농도를 각각 0.04, 0.1, 0.2, 0.4%(w/v)로 선정하여 실험하였다(그림 37). 가시광선을 10분 조사하며 광중합시켜 겔을 제조하였으며 사진과 같은 결과를 얻어내었다. EosinY에 의해 붉은 색을 띠던 전구체 용액의 색이 겔화가 진행 될수록 노란색으로 변했으며, 광가교가 잘 된 경우 3일 동안 PBS에 보관했을 때 분해되지 않고 원래의 형태를 유지하였다. 색깔변화 및 PBS용액에 3일 보관 후 분해 정도를 관찰하여 다음과 같이 가장 겔화가 잘 되는 조건을 얻어낼 수 있었다. 범위 내에서 TEA 농도는 겔화 정도에 큰 영향을 미치지 않으나 NVP 농도에 따라 겔화 정도가 크게 차이가 나는 것을 알 수 있었고, 설정 농도 중 NVP의 농도가 0.2%일 때 3일 보관시 겔이 분해되지 않고 형태 유지를 하였다. 따라서 이후의 실험에서 TEA와 NVP 농도를 각각 0.2%로 설정하여 진행하였다. 겔화 시간의 최소 필요 값을 알아내기 위해 가시광선 조사 시간을 5분, 7분, 8분, 10분으로 설정하여 GelMA 겔을 제조하였다. 7분 조사한 전구체 용액은 졸 형태를 보였으나 8분 조사한 용액부터 모두 겔화되어 단단한 형태를 보였다.

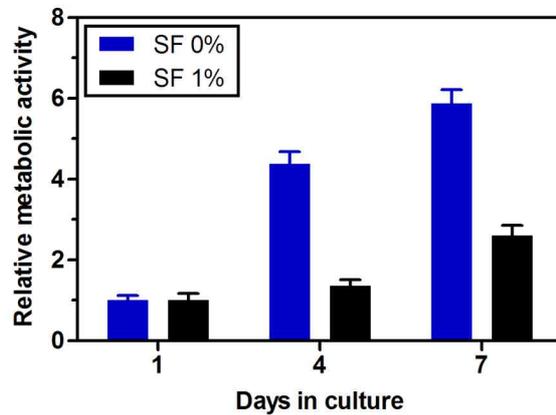


그림 38. 10% GelMA/실크 피브로인 바이오잉크로 제작된 하이드로겔의 MTT assay. SF 0%; 10% GelMA, SF 1%; 10% GelMA와 1% 실크 피브로인.

실크 피브로인 복합 잉크 기반 하이드로겔 내의 세포 생존율을 평가하기 위하여 NIH 3T3 cell을 이용한 alamarblue assay를 실시하였다. 실크 피브로인이 없는 하이드로겔과 실크 피브로인 1% 농도가 포함된 하이드로겔을 제조하고, 각 겔은 NIH 3T3 cell이 1.5×10^6 cells/mL의 농도의 NIH3T3 세포를 함유하고 있다. 10% fetal bovine serum (FBS), penicilin (100Uml^{-1}), streptomycin (100gml^{-1}), HEPES (7.5mM)이 포함 된 DMEM에 하이드로겔을 넣고 5% CO₂ 기체가 포함된 37°C 의 환경에서 7일 동안 배양 하였고, 1일, 4일 그리고 7일차에 alamarblue assay 시약을 처리하여 세포 생존율을 확인 하였다.

그 결과 실크 피브로인이 들어있지 않은 하이드로겔과 1% 실크피브로인이 함유된 겔 모두 7일 동안 세포가 사멸되지 않고 성장하는 것을 확인하였다 (그림 38). 그러나 실크 피브로인 1% 농도 함유된 하이드로겔에서 배양된 세포는 GelMA 하이드로겔과 같은 높은 세포 성장률을 보이지 못하였다. 이는 배양일이 지속됨에 따라 세포가 증식하면서 실크 피브로인이 포함된 하이드로겔이 GelMA 겔에 비해 높은 점도로 인한 세포의 생존 및 성장을 억제하는 영향일 수도 있으며, 공극이 부족으로 인한 겔내의 영양분 공급과 산소 투과율이 저하에 의한 영향일 수도 있을 것으로 보인다.

(5) 실크 피브로인-멜라닌 입자 복합 바이오잉크 제조 및 특성평가

(가) 실크 피브로인-멜라닌 입자 복합체 제조 및 특성평가

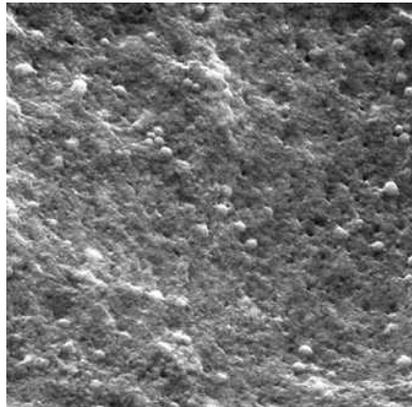


그림 39. 멜라닌 입자를 함유하는 실크 피브로인 입자의 표면 전자현미경 사진

실크 피브로인/멜라닌 복합체는 2 wt%의 실크 피브로인 파우더를 증류수에 재분산하여 사용하였으며, 멜라닌 입자 (Nortindal sea products, spain)는 상용되는 것을 구입하여 셀룰로오스 아세테이트 막(MWCO 12~14 kDa)으로 7일 동안 투석을 하여 염을 완전히 제거 후 사용하였다. 다양한 농도로 멜라닌 입자를 실크 피브로인 파우더 분산액에 추가하였으며, 복합화는 혼합액을 120°C에서 20 분 동안 가열하여 얻었다. 일반적으로 이 연구에서 제조되어 사용된 실크 입자는 수십 마이크로미터의 크기를 보이며, 첨가된 멜라닌 입자는 실크 피브로인 입자 표면에 그림 39와 같이 안정적으로 고정되어 있음을 확인할 수 있었다.

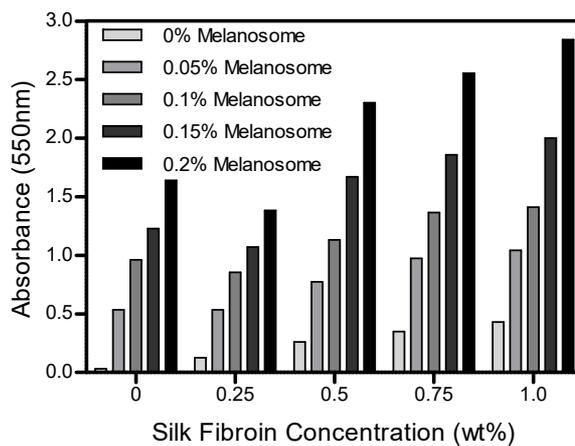


그림 40. 실크 피브로인-멜라닌의 구성비에 따른 실크 피브로인-멜라닌 입자 수용액의 탁도 변화

실크 피브로인-멜라닌 입자의 구성비에 따른 수용액 상에서의 탁도 변화를 확인하였다. 그림 40에서 보이는 바와 같이 실크 피브로인의 농도가 증가함에 따라 수용액의 탁도는 증가하였으며, 동일한 실크 피브로인 농도에 있어서도 멜라닌 입자의 농도가 증가함에 따라 탁도의 지속적인 증가를 관찰하였다. 3D 프린팅에 있어서 용액 탁도는 해상도와 큰 상관관계가 있다. 저농

도의 입자를 혼입하였을 경우에는 일정량까지 산란도의 증가를 보이며 조사빔의 분산을 유발하게 되며 이로 인하여 해상도의 저하를 초래하게 된다. 그러나 고농도의 입자 혼입의 경우에는 빔 투과율이 현저히 감소하고 입자간 치밀도로 인하여 산란도의 증가보다는 표면하부층에서의 흡수 및 반사량 증가를 보이게 된다. 이러한 표면 하부층에서의 빔 반사는 박막 수준의 국부적 가교를 형성하게 함으로써 3D 프린팅의 해상도를 향상시키게 된다.

(나) 실크 피브로인-멜라닌 입자 복합체 함유 바이오잉크 전구용액 제조 및 물성평가

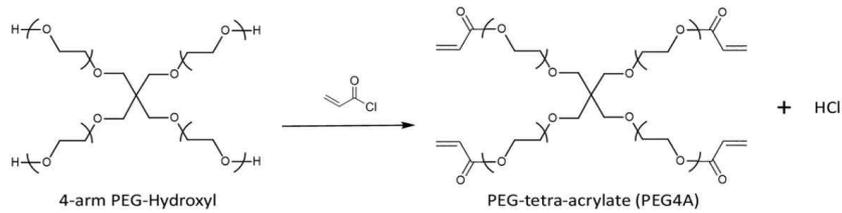


그림 41. 4-arm PEG-hydroxyl과 acryloyl chloride 반응에 의한 PEG-tetra-acrylate (PEG4A) 합성 모식도.

DLP 방식에 있어서 프린팅 해상도는 잉크의 투명도와 밀접한 관계를 보인다. 프린팅 해상도의 향상을 위하여 투명도를 제어할 필요가 있었으며, 이에 멜라닌 미세 입자를 실크에 도입하였다. 대표적인 고투명도 하이드로젤인 폴리에틸렌글라이콜 유도체를 모델로 선정하였으며, 흡광도 (λ 550nm), 입자 복합화, 입자 농도에 따른 해상도 향상 조건을 확인하였다. 폴리에틸렌글라이콜 유도체(PEG-tetra-acrylate, PEG4A)는 4-arm PEG-hydroxyl(20 kDa, JenKem Technology, USA)을 기반 물질로 하여 제조하였으며, 반응에 앞서, PEG-OH는 anhydrous toluene상에서 공용매적으로 건조하였다(그림 41). 이후, anhydrous toluene에 용해된 acryloyl chloride (8 eq. of OH or NH₂ group on PEG)와 trimethylamine (8 eq.)를 천천히 PEG/toluene 용액에 추가를 하였다. 이 반응은 12시간 동안 암실 환경에서 지속되었으며, neutral aluminum oxide 필터를 통하여 triethylamine 염을 제거하였고, 2시간동안 sodium carbonate 상에서 교반하였다. 얻어진 비균질 용액을 얇은 Hyflo 막으로 필터링한 후 얼음에 잠긴 ethyl ether 용액을 이용하여 침전물을 형성시켰다. 침전물은 증류수에 재분산하여 사용하였다.

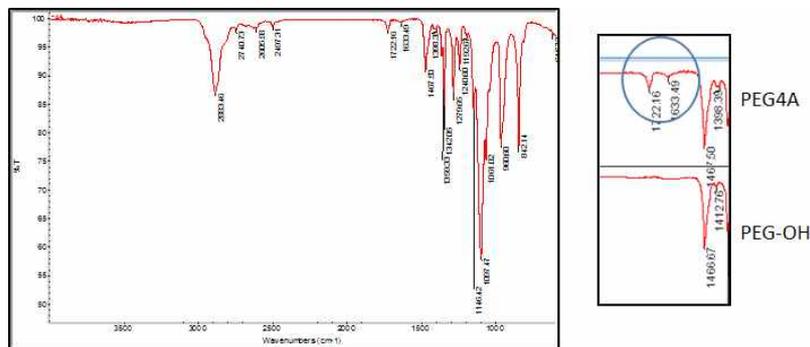


그림 42. PEG4A의 FTIR spectrum

FT-IR 분석을 통하여 PEG4A의 합성을 확인을 하였다. 1723cm^{-1} 에서 나타나는 피크는 합성 반응을 통하여 새롭게 도입된 카르복실기 (C=O)이며 PEG-OH와 acryloyl chloride의 반응 결과인 에스테르기의 존재에 기인하는 것이라 할 수 있다 (그림 42).

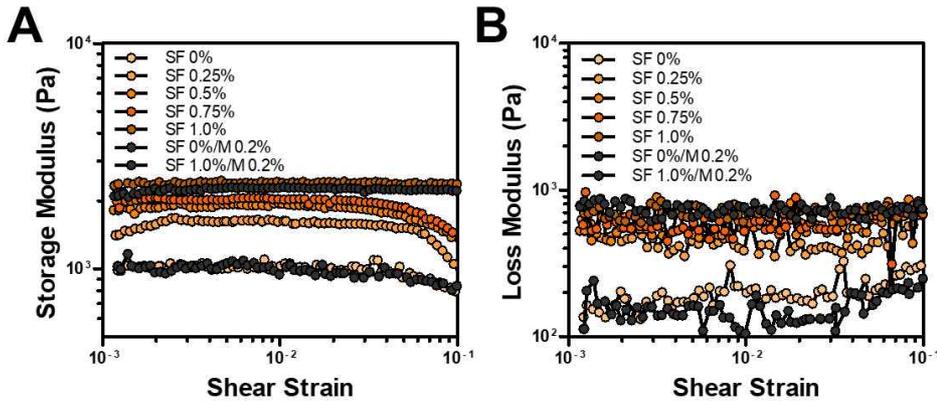


그림 43. (A) 실크피브로인/멜라닌 복합 입자가 PEG4A 전구체 용액의 점도에 미치는 영향
(B) 실크피브로인/멜라닌 복합 입자가 PEG4A 전구체 용액의 전단 탄성 계수에 미치는 영향.

하이드로젤 전구체 용액의 점도는 실크 피브로인을 0 ~ 1.0 wt%의 범위에서 조절되었다. 그림 43에서 보는 바와 같이 실크 피브로인이 첨가된 모든 시료에서 thixotropic 특성을 보였다. 전단력이 증가함에 따라 나타나는 점도의 감소는 용액상 세포의 이동을 용이하게 하여 세포의 생존율을 높일 수는 있으나, 세포 침전이 나타날 수 있는 가능성을 보이게 된다. 그러나 실험 상에서 바이오잉크에 부여되는 전단력이 거의 없다고 가정할 때, 즉 shear rate 0에서의 점도를 비교하여, 최적의 점도 조건을 확보할 수 있었다. 그림에 나타난 바와 같이 실크 피브로인의 농도가 증가함에 따라 점도의 증가가 확인되었으며 1.0 wt%를 최적 조건으로 선정하였다. 1.0 wt%를 초과하는 경우에는 점도의 상승이 더 크게 나타나지만 3D 프린팅시에 점성이 너무 크게 나타나 적절한 도포가 불가능하였으며, 이에 실험상 최대 농도를 실크 피브로인 1.0 wt%로 하였다.

하이드로젤 전구체 용액의 storage modulus G' 와 loss modulus G'' 는 실크 피브로인 입자의 함유량이 증가함에 따라 증가하는 경향을 보였다. 또한 실크피브로인/멜라닌 복합 입자를 함유하였을 경우에는 전구체 용액의 점도와 전단 탄성 계수의 변화가 실크 피브로인을 첨가하였을 경우와 비교하여 큰 변화를 보이지 않았다. 이를 통하여 멜라닌의 복합화가 전구체 용액의 점탄성에 영향을 미치지 않으며 실크 피브로인 함유량에 의하여 결정된다고 할 수 있다.

(다) 실크 피브로인-멜라닌 입자 복합체 함유 바이오잉크 전구용액의 DLP 3D 프린팅 해상도 평가

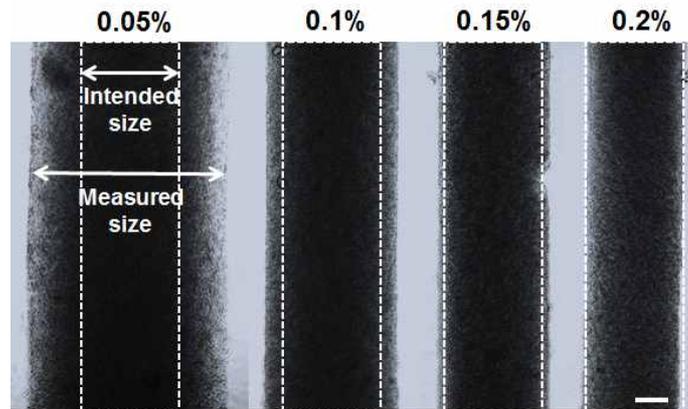


그림 44. 복합된 멜라닌의 농도 변화에 따른 3D 프린팅된 하이드로젤의 광학 현미경 이미지. 디자인상의 폭을 점선으로 표시. 실크 피브로인 입자의 농도를 1 wt%로 고정.

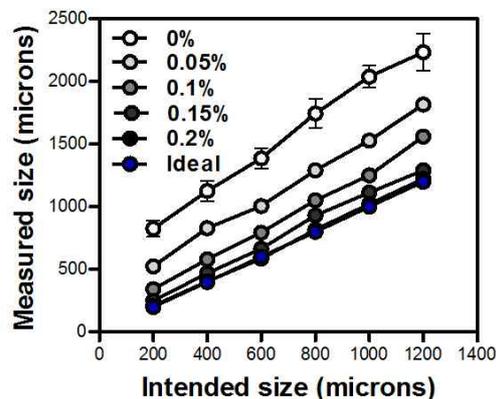


그림 45. 멜라닌 함유 농도에 따른 디자인상의 폭 길이와 프린팅 구조물의 폭 길이 간의 상관 관계. 실크 피브로인 입자의 농도는 1 wt%로 고정.

바이오잉크의 해상도의 평가를 위하여 실크 피브로인과 멜라닌 입자의 혼합율을 변화하여 빔을 조사하였다. 바이오잉크의 점탄성 특성에 대한 예비실험을 통하여 획득한 최적의 프린팅 조건인 1 wt%의 실크 피브로인을 기준으로 하여 멜라닌 입자의 혼합비를 조절하였다. 바이오잉크의 투명도가 증가함에 따라 구조체 디자인의 왜곡이 심하게 나타남을 확인하였다. 이러한 디자인 왜곡은 빔의 분산 현상에 의한 것으로 조사 범위가 증가함에 따라 더욱 확대되는 경향이 있었다. 또한 멜라닌 입자가 함유되지 않은 조건에 실크 피브로인의 첨가량을 증가시킬 경우에는 용액상의 산란도가 증가하게 되어 디자인 왜곡은 더욱 심화되는 경향이 있었다. 본 연구에서 사용한 1 wt%의 실크 피브로인은 최대의 첨가량이라 할 수 있으며, 디자인 왜곡이 매우 큰 경우에 해당되었다. 이러한 디자인 왜곡은 멜라닌 함유를 통하여 조절될 수 있었으며, 그림 25에서 보이는 바와 같이 멜라닌 함유량이 증가함에 따라 선명도가 증가하였고, 초기 디자인의 크기에 부합하는 구조체를 획득할 수 있었다. 멜라닌 함유에 따른 해상도 증가를 200 ~ 1200 μm 의 크기에서 확인하였으며, 전체적으로 0.2%의 멜라닌 함유에서 최적의 효과를 보여 이상

적인 해상도와 거의 일치하였다 (그림 44, 45).

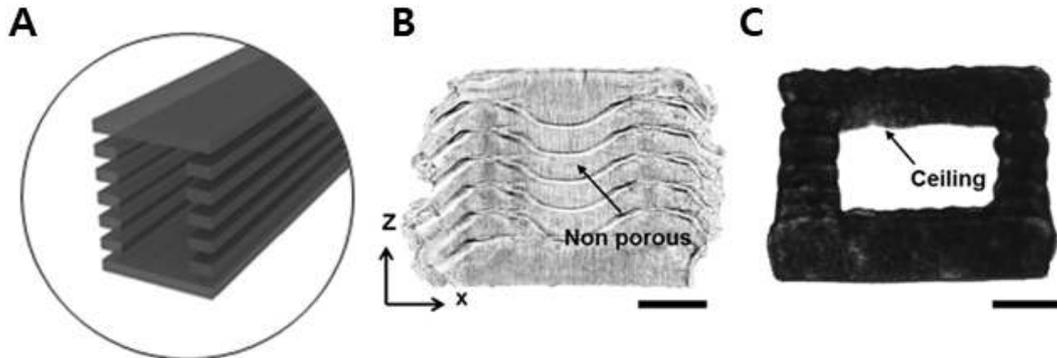


그림 46. 사각 관 형태의 하이드로젤 3D 구조체의 단면 비교. (A) 사각 관의 디자인 및 빔 조사층의 모식도, (B) 복합체 미함유의 투명 PEG4A, (C) 실크피브로인/멜라닌 입자가 함유된 PEG4A.

바이오잉크를 이용한 3D 구조체의 프린팅 효율을 가장 잘 확인할 수 있는 디자인은 내부가 비어 있는 공극 구조라 할 수 있다. **그림 46**에서 보이는 바와 같이 투명한 잉크를 사용하였을 경우에는 빔의 투과로 인하여 내부의 공극을 구현할 수 없게 된다. 광 투과제어제를 함유하지 않는 실크피브로인의 경우에는 공극 부분에도 광이 투과 조사되어 경화가 발생하므로 원하는 공극을 획득할 수 없었다. 또한 빔의 분산 및 퍼짐 현상으로 기둥의 경우에도 디자인한 것에 비하여 확대된 구조체가 형성됨을 알 수 있었다. 반면에, 광 투과제어제로 사용된 멜라닌이 함유된 바이오잉크의 경우에는 ceiling 부분이 구현되었으며, 기둥 부분 또한 적절히 구현되어 3D 프린팅의 효율을 검증할 수 있었다.

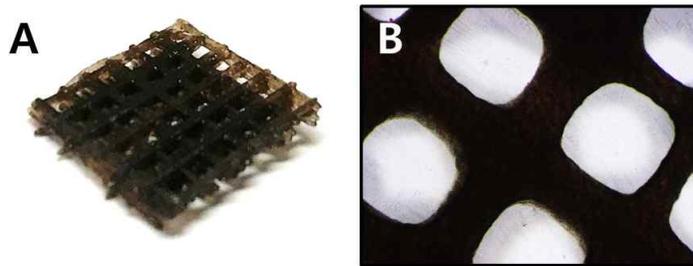


그림 47. 최적화 조건에서 3D 프린팅된 (A) 격자 구조물의 사진 및 (B) 공극의 현미경 사진.

바이오잉크의 3D 구조체는 **그림 47A**와 같은 그물망 구조로 구현하였다. 일반적으로 조직공학용 스케폴드는 물질의 내외부 교환이 가능한 공극을 필요로 하며 이를 통하여 세포의 생존율을 증가시키게 된다. 따라서 본 연구에서는 가로 세로의 선을 순차적으로 조사하여 입체를 구현하고자 하였다. 구조체의 높이는 스테이지를 제어하여 조절하였고, 조사되지 않은 부분은 가교가 일어나지 않아 최종 공정에서 세척되도록 하였다. 폭 $500\mu\text{m}$, 길이 1cm 의 구조체를 형성하였으며, PBS 용액 세척 공정후의 구조체의 형상은 **그림 47B**와 같다. 제조된 선의 폭을 측정 한 결과 디자인에 적용되었던 $500\mu\text{m}$ 와 일치하여 고해상도의 프린팅 구현을 확인하였다.

(6) 실크 피브로인-리보플라빈 복합 바이오 잉크 제조 및 특성평가

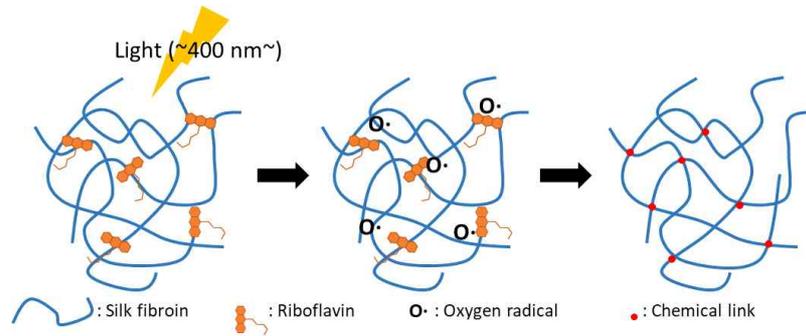


그림 48. 실크 피브로인-리보플라빈 하이드로젤의 제조 모식도.

본 연구에서는 가시광선 영역에서 가교를 유도하는 개시제로서 리보플라빈을 사용하였다. 리보플라빈은 비타민 B의 일종으로서, 광 자극에 의해 단백질 사슬의 Tyrosine(Tyr) 잔기에서 자유라디칼 반응을 통해 Dityrosine 결합을 유도한다. 리보플라빈을 개시제로 사용하면 실크 피브로인에 별다른 개질 없이 빛을 조사하여 가교를 형성할 수 있으며, 생체적합성이 뛰어나다는 장점이 있다.

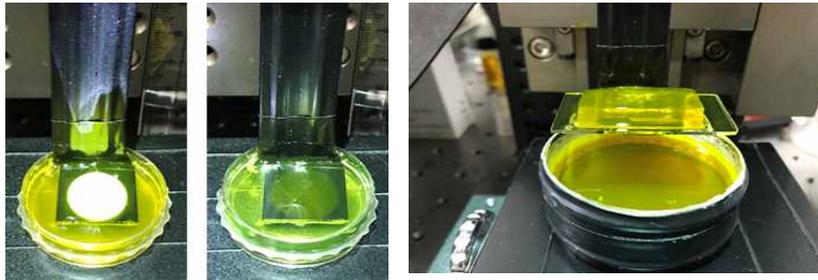


그림 49. 가시광선 조사를 통한 실크 피브로인-리보플라빈 하이드로젤의 제조.(실크 피브로인은 5 wt%, 리보플라빈은 1 mM농도로 사용되었다.)

위 그림에서와 같이 가시광선을 조사하여 실크 피브로인-리보플라빈 하이드로젤을 제조할 수 있었다. 이 때 10,000 LUX의 빛을 5분씩 조사하였으며 이를 적층하여 삼차원 구조체를 제조할 수 있었다. 용해되어 있는 리보플라빈으로 인하여 전구체 용액은 노란색을 띠었으며, 특별한 세척 공정 없이 물에 담지한 후에는 리보플라빈이 빠져 나가게 되어 탈색이 되는 것을 확인할 수 있었다.

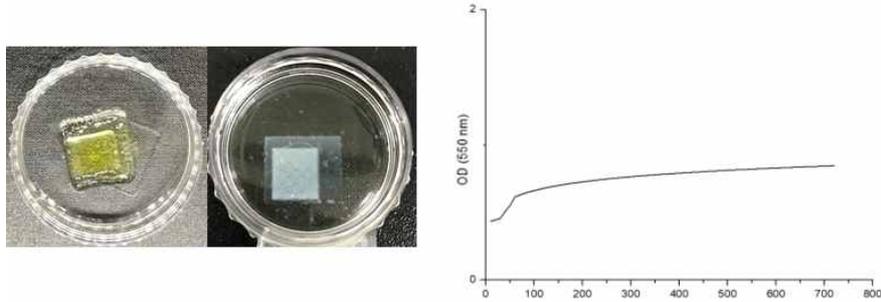


그림 50. 하이드로젤을 37°C 에서 보관할 때의 변화.

제조된 실크 피브로인-리보플라빈 하이드로젤을 37°C 에서 보관하는 경우, 투명했던 하이드로젤이 불투명한 하얀색이 되며, 강도가 급격히 증가하는 결과를 관찰할 수 있었다. UV-visible 분광기를 통해 37°C 에서 하이드로젤의 탁도를 관찰한 결과, 약 40분이 경과하였을 때 급격한 탁도 증가를 보였다. 이는 실크 피브로인 분자간의 베타시트 구조 형성에 기인하는 것으로 판단된다.

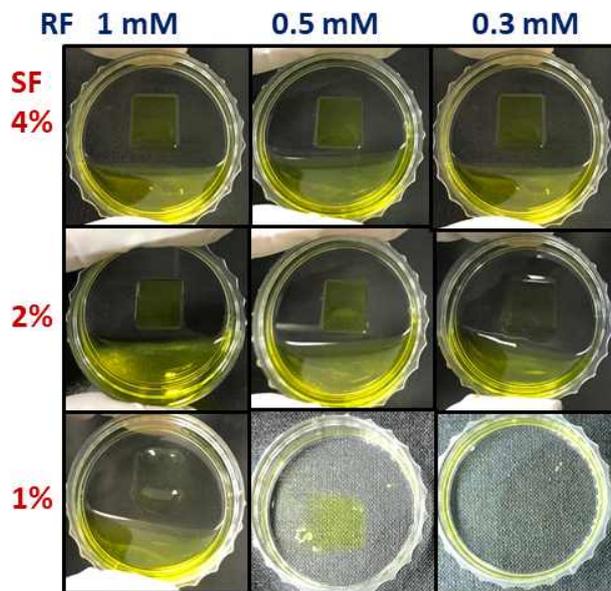


그림 51. 실크 피브로인과 리보플라빈 농도에 따른 젤화 경향.

실크 피브로인과 리보플라빈 용액의 젤화를 위한 바이오 잉크 물질들의 조합비율을 찾기 위해 위와 같은 실험을 진행하였다. 문헌조사 결과 리보플라빈이 0.1 mM 이상에서 세포 독성이 나타나는 것을 알아내었다. 바이오 잉크로 사용하기 위해서 잉크에 사용되는 리보플라빈의 양을 최소로 해야 하며, 이에 따라 사용되는 실크 피브로인의 농도도 낮추어야 한다. 실험 결과, 실크 피브로인 4 wt%일 때는 리보플라빈의 0.3 ~ 1 mM 사이의 어떤 농도에서도 젤화가 잘 되었다. 실크 피브로인 2 wt%일 때는 리보플라빈을 0.5 mM 이상 사용해야 뚜렷한 젤화가 진행되는 것을 확인하였다. 실크 피브로인 1 wt%일 때는 리보플라빈 1 mM 농도에서도 젤화가 진행되지 않았다.

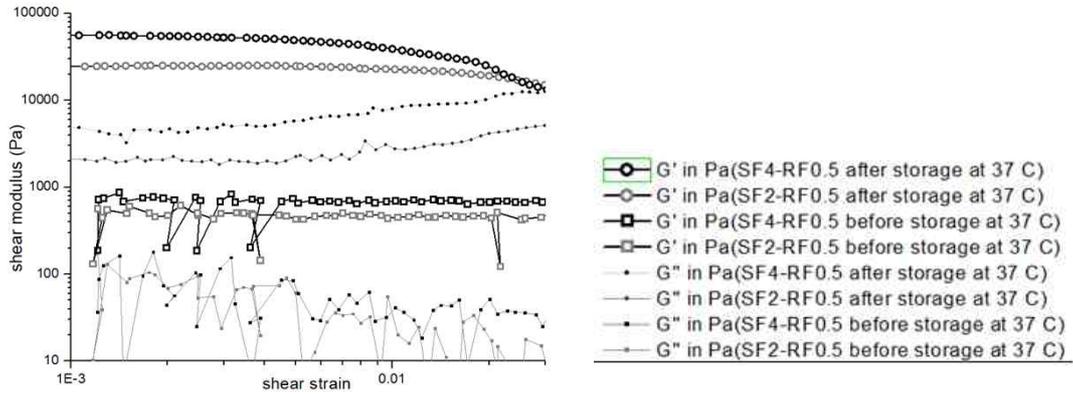


그림 52. 실크 피브로인 농도와 37°C 보관에 따른 전단 탄성률 평가.

실크 피브로인 농도 2 wt%와 4 wt%를 사용했을 때, 37°C에서의 보관에 따른 전단 탄성률의 차이와 변화를 레오미터를 통해 확인하였다. 실크 피브로인을 4 wt% 사용했을 때가 2 wt% 사용하였을 때 보다 더 높은 전단 탄성률을 보였으며, 모든 하이드로젤에서 37°C 보관 시에 전단 탄성률이 증가하는 경향을 보였다.

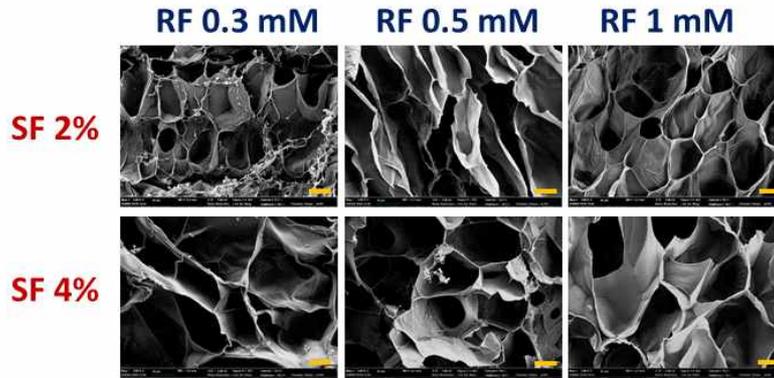


그림 53. 실크 피브로인과 리보플라빈 농도에 따른 단면 구조의 FE-SEM 이미지.

제조된 하이드로젤을 액체 질소에 넣어 공극을 순간 고정시킨 후 동결 건조하였고 시료 단면의 FE-SEM 이미지를 통하여 다공성의 구조를 확인할 수 있었다. 모든 시료에서 세포 활성화에 필요한 공극 구조를 보이는 것을 확인했다. 리보플라빈 농도에 의한 단면 구조의 차이는 뚜렷하지 않았으나, 실크 피브로인의 농도가 높은 경우 공극간 벽의 두께가 상대적으로 크게 나타났다.

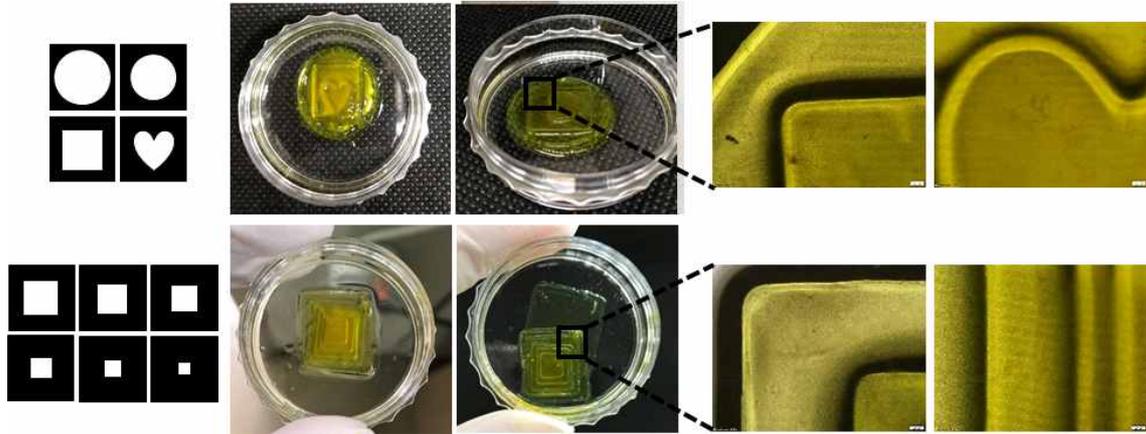


그림 54. 실크피브로인-리보플라빈 하이드로젤의 Stage-down 방식 DLP 3D 프린팅 결과

DLP 3D 프린팅 시스템을 통해 다양한 모양과 층으로 실크 피브로인-리보플라빈 하이드로젤을 제조해보았다. 그림 54에서 보이는 바와 같이 디자인한 모양에 따라 500 μm 두께로 적층이 효율적으로 진행되었음을 확인할 수 있었다. 각 층의 경계를 광학 현미경으로 관찰해본 결과 비교적 뚜렷한 경계면을 보여 고해상도 프린팅의 가능성을 보여 주었다.

(7) 피부 유사 구조체의 3D 프린팅을 위한 실크 피브로인 함유 바이오잉크 제조 및 특성 평가
 (가) PEG4A/실크 피브로인 함유 복합 바이오잉크의 프린팅 및 물성 평가

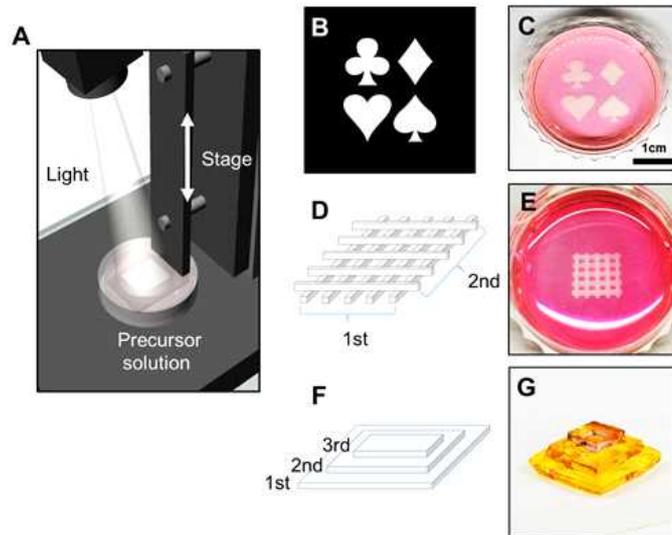


그림 55. DLP 3D 프린팅 시스템으로 제조된 PEG4A/1% 실크 피브로인 하이드로젤 디자인과 구조물. (A) DLP 3D 프린팅 시스템 모식도, (B) 단층 구조물 디자인, (C) 단층 구조물 사진, (D) 격자 구조물 디자인, (E) 제작된 격자 구조물 사진, (F) 다층 구조물 디자인, (G) 제작된 다층 구조물 사진.

PEG4A/1% 실크 피브로인 하이드로젤의 프린팅 정확도를 확인하기 위하여 다양한 구조물들을 제작하였다. 전구 용액은 가시광선에 의해 5분간 조사하여 하이드로젤을 제작하였으며, 하이드로젤의 z축은 **그림 55A**에서 알 수 있듯 스테이지를 조절하여 조절하였다. 이러한 시스템을 이용하여 2D 단층 구조물을 디자인하여(**그림 55B**) 단층 구조물 하이드로젤을(**그림 55C**) 제작하였다. 조사된 단층 구조물은 PBS buffer를 이용해 조사되지 않고 남은 전구 용액을 제거하여 원하는 구조물만 얻을 수 있었다. 스테이지를 조절하여 **그림 55D,E** 와 같이 3D 격자 구조물을 디자인하여 제작하였다. 첫 번째 층의 구조물을 광조사를 통하여 제작한 후 스테이지를 밑으로 낮추어 구조물 표면으로 전구 용액이 잠기게 한 뒤 같은 조건으로 두 번째 층을 조사하여 격자 구조물을 제작하였다. 또 한 같은 방식으로 구조물들을 적층한 다층 구조물을 디자인하여 제작하였다(**그림 55F,G**). 이 구조물 역시 앞서 기술한 격자 모양의 구조물 제작 방식과 같은 원리인 스테이지 이동을 통하여 다층 구조물을 제작하였다. 다음의 구조체들의 제작을 통해 알 수 있듯 전구 용액을 광 조사하여 하이드로젤을 원하는 디자인으로 할 수 있으며, 프린팅 정확도가 높음을 확인하였다.

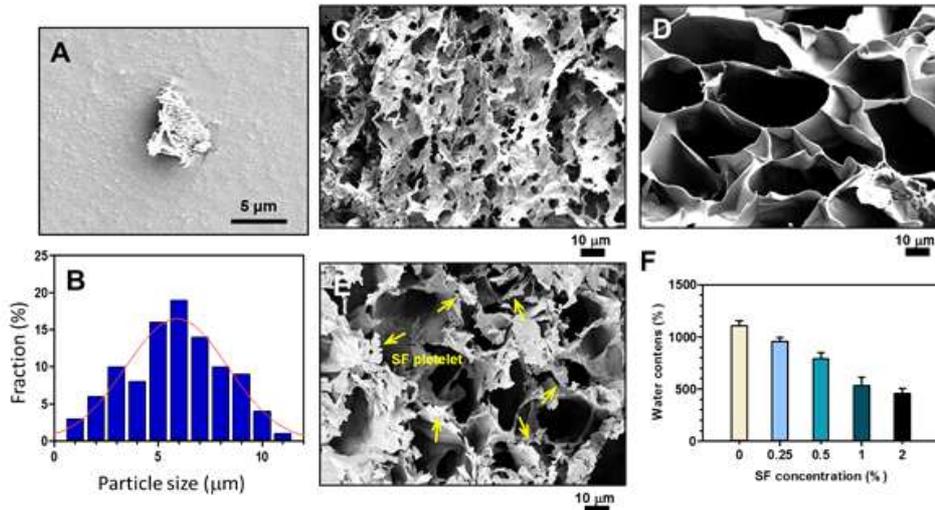


그림 56. 실크 피브로인 입자와 하이드로젤의 물성평가. (A) 실크 피브로인 입자의 전자현미경 사진, (B) 실크 피브로인 입자의 크기 분포, (C) 실크 피브로인의 전자현미경 사진, (D) PEG4A 하이드로젤 단면의 전자현미경 사진, (E) PEG4A/1% 실크 피브로인 하이드로젤 단면의 전자현미경 사진, (F) 실크 피브로인 함량에 따른 water contents 의 변화.

실크 피브로인 입자 분산액은 정제 완료된 실크 피브로인 용액에 Tip sonicator를 이용하여 전단력을 가해 젤화시켜 주었다. 10 분간 Tip sonication을 가하였고, 10,000RPM으로 30초간 원심분리 후 얻은 용액의 상등액만을 취하여 실험에 사용하였다. 용액 내에서 입자가 잘 분산되어 있는 것을 광학 현미경으로 확인하였으며, 입자는 1~11μm 크기의 분포를 나타내었고 평균 크기는 6μm 였다(그림 56A,B). 제조된 하이드로젤을 액체 질소에 넣어 공극을 순간 고정시킨 후 동결 건조하였고 시료 단면의 전자현미경 사진을 통하여 다공성의 구조를 확인할 수 있었다 (그림 56C,D,E). 실크 피브로인 입자가 PEG4A 하이드로젤 단면에 균일하게 퍼져있는 모습을 확인하였다. 균일하게 퍼져있는 실크 피브로인 입자는 PEG4A 하이드로젤의 물성을 높이는 직접적인 원인임을 확인하였다. 실크 피브로인 함량에 따른 하이드로젤의 water contents를 측정하기 위해 1 mm 두께의 하이드로젤을 초순수에 담지하여 24시간 동안 미반응 시약을 제거 팽윤시킨 뒤 흡윤질량을 측정하였다. 그 후 진공건조기에서 건조 후 건조질량을 측정하였다. 함수율과 팽윤도는 직접적인 관계가 있으므로 하이드로젤의 팽윤도를 측정하면 함수율의 변화를 확인할 수 있다. 본 실험에서는 증류수의 흡수만을 유도하였으므로 팽윤도를 함수율과 동일한 것으로 가정하여 흡윤질량과 건조질량의 비로 정의하였다. 그림 56F 에서 알 수 있는 바와 같이 실크 함량이 증가함에 따라 water contents 가 감소하는 경향을 보였다. 하이드로젤 단위 질량당 실크 피브로인의 함량이 증가하였고, 실크 피브로인이 불용성 및 결정성이 높은 입자의 형태로 존재하기 때문에 물을 담지하기 위한 공극의 형성을 억제할 가능성이 있다. 따라서 water contents 는 감소할 것으로 예상 되었으며, 실험 결과에 있어서도 동일한 경향이 확인되었다.

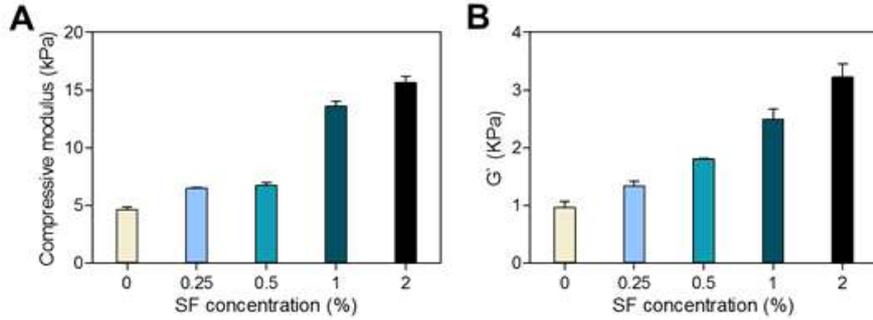


그림 57. 실크 피브로인 함량에 따른 하이드로젤의 압축강도 변화 (A)와 G' 변화 (B)

하이드로젤 내부에 실크 피브로인이 함유됨에 따른 물성 변화를 확인하기 위하여 Universal Testing Machine (LRX Plus, LLOYD Instruments Inc., Bognor Regis, UK)을 이용하여 압축강도를 측정하였다. 지름 0.8cm 두께 0.1cm인 PEG4A 하이드로젤 디스크를 제작하고 각 젤에 실크 피브로인을 0.25%, 0.5%, 1%, 2%가 함유되게 하여 샘플을 준비하였다. 측정 결과 실크 피브로인이 높은 농도로 함유 될수록 압축강도는 커지는 것으로 확인하였다. 이는 PEG4A 하이드로젤 공극 사이에 실크 피브로인이 들어가 압축강도를 크게 해준 것으로 전자현미경 사진을 통해 확인하였다. 또 한 Digital rheometer를 이용하여 (MARS III, Thermo Scientific, Newington, NH, USA) G'값을 측정하였다. 측정 결과 압축강도와 마찬가지로 실크 피브로인의 농도가 증가할 수록 하이드로젤의 G'값이 증가하는 것으로 확인하였다. 이는 앞서 기술된 이유와 같이 하이드로젤 단위 질량당 실크 피브로인의 함량이 증가하였고, 실크 피브로인이 불용성 및 결정성이 높은 입자의 형태로 존재하기 때문이다.

(나) PEG4A/실크 피브로인 함유 복합 바이오잉크의 세포독성평가

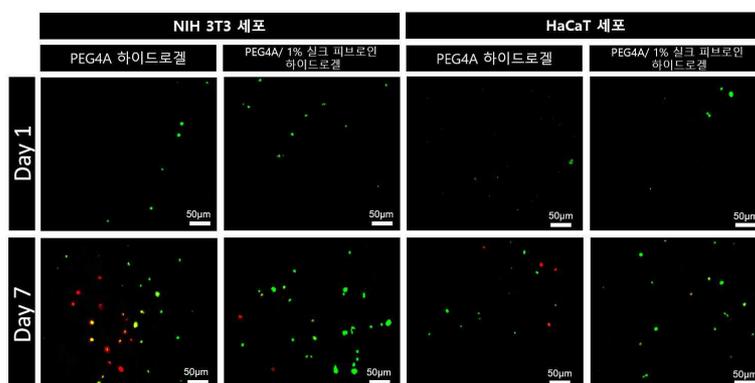


그림 58. NIH 3T3 세포가 함유된 PEG4A 하이드로젤, PEG4A/1% 실크 피브로인 하이드로젤 그리고 HaCaT 세포를 젤 표면에 씨딩 시킨 PEG4A 하이드로젤, PEG4A/1% 실크 피브로인 하이드로젤에 대한 Live and Dead assay 이미지.

실크 피브로인의 세포독성 정도를 평가하기 위하여 실크 피브로인 유무에 따른 PEG4A 하이드로젤의 Live and Dead assay를 실시하였다. 세포는 NIH 3T3 세포와 HaCaT 세포 두 종류를 사용하여 각각 실험군을 준비하였는데, NIH 3T3 세포는 하이드로젤의 내부에 함유시키고, HaCaT 세포는 하이드로젤의 표면에 씨딩 시켰다. 두 종류의 세포를 따로 실크 피브로인이 포함되지 않은 하이드로젤과 실크 피브로인이 1% 함유된 하이드로젤을 제조하였으며, 각 하이드로젤의 세포는 1.0×10^6 cells/mL 농도로 포함되어 7일간 37°C 인큐베이터에서 배양시킨 뒤 세포 독성 정도를 확인하였다. 그 결과 NIH 3T3 세포군과 HaCaT 세포군 모두 실크 피브로인이 1% 함유된 하이드로젤의 세포독성 정도가 실크 피브로인이 포함되지 않은 하이드로젤에 비해 더 적음을 알 수 있었다. 이는 잘 알려진 대로 실크 피브로인이 세포의 부착 능력을 향상하게 시키고 세포의 활성을 높이는데 기여 하는 것을 확인하였다 (그림 58).

시험 성적서

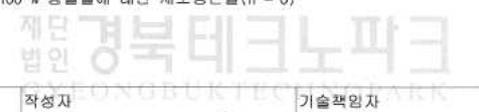
 경북테크노파크 STONGBUKTECHNOPARK 우38412 경상북도 경산시 외촌면 송구봉길 18 (Tel: 053-819-8120, Fax: 053-819-8118)	시험성적서번호 : 18-030803 페이지 (1) / (총 3)							
1. 의뢰자 * 기관명 : ㈜극동중앙연구소 * 주소 : 부산시 사하구 하신번영로 135, 3층 2. 시험대상 품목/물질/시료 설명 : P 3. 시험기간 : 2018년 10월 29일 - 2018년 11월 07일 4. 시험방법 : ISO 10993-5:2009, Annex C MTT cytotoxicity test 5. 시험결과 :								
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 33%;">시험항목</th> <th style="width: 33%;">시료명</th> <th style="width: 33%;">시험결과*</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">세포독성</td> <td style="text-align: center;">P</td> <td style="text-align: center;">음성, (89.2 ± 4.8) %</td> </tr> </tbody> </table>			시험항목	시료명	시험결과*	세포독성	P	음성, (89.2 ± 4.8) %
시험항목	시료명	시험결과*						
세포독성	P	음성, (89.2 ± 4.8) %						
* 시험물질 100% 용출물에 대한 세포생존율 (n = 6)								
								
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 30%; text-align: center;"> 확인 작성자 성명 : 박정호 </td> <td style="width: 40%; text-align: center;"> 기술책임자 성명 : 안재진 </td> </tr> </table>			확인 작성자 성명 : 박정호	기술책임자 성명 : 안재진				
확인 작성자 성명 : 박정호	기술책임자 성명 : 안재진							
1. 이 시험성적서는 의뢰자가 제시한 시료 및 시료명으로 시험한 결과로서 전체 제품에 대한 품질을 보증하지는 않습니다. 2. 이 시험성적서는 당 기관의 사전 서면 동의 없이 홍보, 선전, 광고 및 소송용으로 사용될 수 없으며, 용도 이외의 사용을 금합니다. 3. 당 기관의 직인이 없는 경우에는 시험성적서의 효력이 없습니다.								
2018년 11월 08일 (재)경북테크노파크 원장 (인)								
GBTP-KQP-24-F02	(재)경북테크노파크	A4(210 X 297)						

그림 59. PEG4A/1% 실크 피브로인 하이드로젤의 세포 독성 평가 시험성적서.

생물학적 안전성 평가를 위해 경북 테크노파크에 위치한 첨단메디컬 융합섬유센터에서 국제 표준규격을 따르는 세포독성평가를 의뢰하여 진행하였다. 시험절차는 국제시험규격인 ISO 10993-5:2009 “Test for in vitro cytotoxicity” 를 따라 진행되었으며, 마우스의 결체조직에서 유래된 L-929세포를 ISO 10993-5:2009, Annex C MTT cytotoxicity test, C.2.2.1 cell line 항에 의거 하여 실험에 사용하였다. PEG4A/1% 실크 피브로인 하이드로젤을 MEM05 (5% fetal bovine serum in MEM with penicillin/streptomycin) 배지에 0.1g/ml의 비율로 37°C에서 24시간 동안 용출시켜 여과시킨 용출물을 100%로 정하였다. 이 100% 용출물을 50%, 25%, 12.5% 농도로 MEM05 배지에 희석하여 각 농도에 대한 세포 생존율을 확인하였다. 시험 분석결과 100% 용출물에 대한 세포 생존율은 89.2%로 세포독성에 대하여 음성인 것으로 확인되었다. 또한 용출물이 배지에 50%, 25%, 12.5% 로 희석 되었을때의 세포 생존율은 각각 94.3%, 96.5%, 96.4% 로 전 농도 범위에 걸쳐 독성 양성 기준치 70%를 크게 상회 하는 것으로 확인되었다. 이 시험 분석의 결과로 1% 실크 피브로인이 함유된 PEG4A 하이드로젤을 이용하여 인공피부의 제조하는데 세포독성의 영향이 없을 것으로 판단되었다.

(다) PEG4A/실크 피브로인 함유 복합 바이오잉크의 기저 세포 담지 하이드로젤 프린팅 및 HaCaT 세포 배양

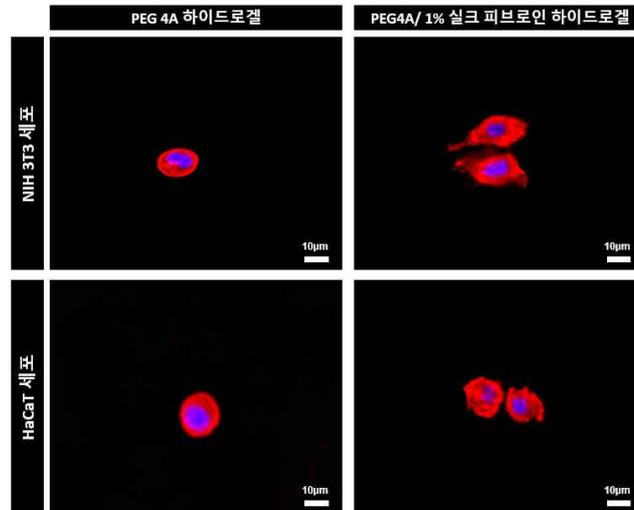


그림 60. PEG4A 하이드로젤, PEG4A/1% 실크 피브로인 하이드로젤에 함유된 NIH 3T3 세포 그리고 PEG4A 하이드로젤, PEG4A/1% 실크 피브로인 하이드로젤 표면에 씨딩 된 HaCaT 세포의 공초점 현미경 이미지.

실크 피브로인의 함유 유,무에 따른 하이드로젤에 포함된 NIH 3T3 세포와 표면에 씨딩 된 HaCaT 세포의 형태를 분석하기 위하여 phalloidin/DAPI 염색을 실시하였다. 세포는 NIH 3T3 세포와 HaCaT 세포 두 종류를 사용하여 각각 실험군을 준비하였는데, NIH 3T3 세포는 하이드로젤의 내부에 함유시키고, HaCaT 세포는 하이드로젤의 표면에 씨딩 시켰다. 두 종류의 세포를 따로 실크 피브로인이 포함되지 않은 하이드로젤과 실크 피브로인이 1% 함유된 하이드로젤을 제조하였으며, 각 하이드로젤의 세포는 1×10^6 cells/mL 농도로 포함되어 7일간 37°C 인큐베이터에서 배양시킨 뒤 Phalloidin/DAPI 염색 후 공초점 현미경으로 이미지를 획득하였다. 그 결과 NIH 3T3 세포군과 HaCaT 세포군 모두 실크 피브로인이 1% 함유된 하이드로젤의 세포 형태가 실크 피브로인이 포함되지 않은 하이드로젤에 비해 잘 퍼져서 하이드로젤에 붙어 있는 상태를 관찰하였다. 이를 통하여 실크 피브로인이 함유된 PEG4A 하이드로젤의 내부와 표면에 NIH 3T3 세포와 HaCaT 세포가 정상적인 형태로 잘 자라는 것을 알 수 있었다. 반면에 실크 피브로인이 함유되지 않은 PEG4A 하이드로젤의 내부와 표면의 NIH 3T3 세포와 HaCaT 세포 형태는 둥근 형태를 유지함으로 비정상적인 형태로 실험에 적합하지 않음을 확인하였다.

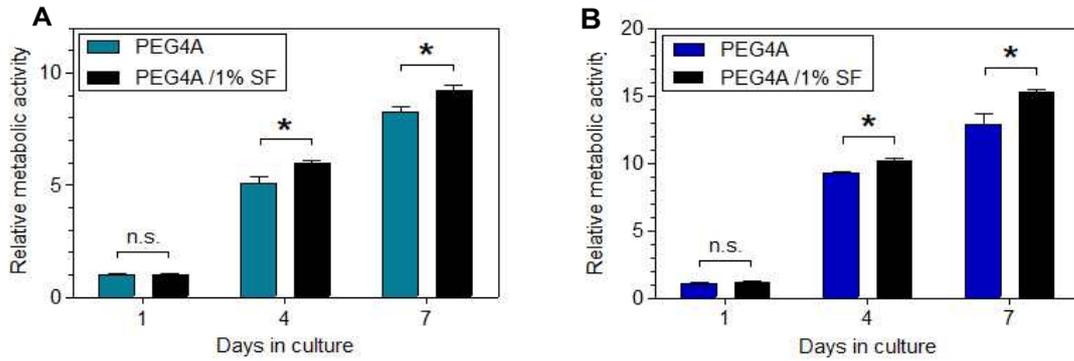


그림 61. (A) NIH 3T3 세포와 (B) HaCaT 세포를 이용한 PEG4A/실크 피브로인 하이드로젤의 Alamar blue assay.

실크 피브로인 복합 잉크 기반 하이드로젤 내의 세포 생존율을 평가하기 위하여 NIH 3T3 세포와 HaCaT 세포를 이용한 alamarblue assay를 실시하였다. 실크 피브로인이 없는 하이드로젤과 실크 피브로인 1% 농도가 포함된 하이드로젤을 제조하고, 각 겔은 NIH 3T3 세포가 1.0×10^6 cells/mL의 농도의 NIH 3T3 세포를 함유하고, 또 다른 실험군으로 1.0×10^6 cells/mL의 농도의 HaCaT 세포가 표면에 씨딩 되어 있었다. 그 결과 두 개의 실험군 모두 실크 피브로인이 들어있지 않은 하이드로젤과 1% 실크 피브로인이 함유된 겔 모두 7일 동안 세포가 사멸되지 않고 성장하는 것을 확인하였다. 그러나 실크 피브로인 1% 농도 함유된 하이드로젤에서 배양된 세포는 PEG4A/1%실크 피브로인 하이드로젤과 같은 높은 세포 성장률을 보이지 못하였다. 또한 두 실험군 모두 t-test를 통해 통계적인 해석결과, 4일차와 7일차 차이가 의미 있음을 알 수 있었다. 이를 통하여 1% 실크 피브로인이 포함된 PEG4A 하이드로젤이 PEG4A 하이드로젤에 비해 높은 세포 부착 능을 갖고 이를 통해 세포 활성도가 상대적으로 높아졌음을 확인하였다.

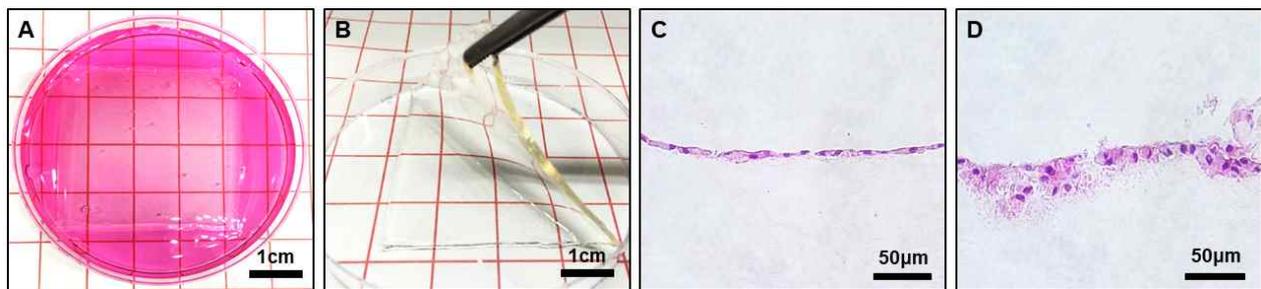


그림 62. NIH 3T3 세포 함유 하이드로젤 프린팅 및 HaCaT 세포 배양: (A) NIH 3T3 세포 함유 하이드로젤 프린팅 직후, (B) 세척 후 기관으로부터 분리된 NIH 3T3 세포 함유 하이드로젤. H&E 염색을 통한 케라틴층 형성 확인: (C) 2주 배양, (D) 6주 배양.

피부 유사체 제작을 위해 앞서 서술된 조건의 PEG4A/1% 실크 피브로인 하이드로젤의 표면에 HaCaT 세포를 씨딩하고, 내부에 NIH 3T3 세포를 함유시켜 공배양을 실시하였다. 실크 피브로인 1% 농도가 포함된 하이드로젤을 제조하고 (그림 62A와 62B), 각 하이드로젤에 NIH 3T3 세포를 1.0×10^6 cells/mL의 농도로 함유 시켰다. 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin

(100Uml⁻¹), streptomycin (100gml⁻¹)가 포함 된 DMEM에 하이드로젤을 넣고 5% CO₂ 기체가 포함 된 37°C의 환경에서 7일 동안 배양하였다. 7일 차에 HaCaT 세포를 1.0×10⁶ cells/mL의 농도로 하이드로젤 표면에 씨앗하여 같은 환경에 마찬가지로 7일 동안 배양하였다. 다시 7일 후에 하이드로젤의 표면이 수면 위로 올라오게 하여 배양시키는 Air liquid interface 배양을 실시하고 그 후 약 6주에 걸쳐 배양하였다. 6주간 배양된 인공 피부 모사체는 H&E 염색을 통하여 HaCaT 세포에 의해 분화된 케라틴 층의 두께를 확인하였다. 그 결과 약 2주간 배양된 케라틴 층(그림 62C)이 단층이었음과 비교하면 6주 간 배양된 케라틴 층은 두꺼운 다층 구조였음을 확인 할 수 있었다(그림 62D). 이를 통하여 실크 피브로인 기반 인공피부 모사체 제작이 가능함을 확인 하였다. 실크 피브로인의 바이오 잉크로 사용 가능성을 확인하였다.

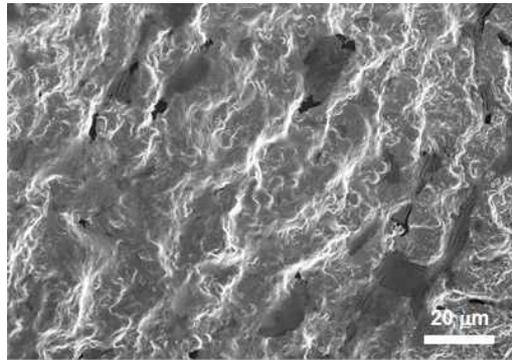


그림 63. 형성된 케라틴층 표면의 전자현미경 사진

케라틴층 표면을 관찰하기 위하여 전자현미경을 이용하여 관찰하였다. 케라틴이 형성된 PEG4A/1% 실크 피브로인 하이드로젤을 4% 파라포름알데하이드 용액에 약 30분 담구어 하이드로젤 표면과 내부에 함유된 세포들을 고정시키고, 액체 질소에 넣어 순간적으로 하이드로젤을 냉동 고정시켰다. 그 샘플을 동결 건조하였고 시료 표면을 전자현미경 사진을 통하여 케라틴층 형성 여부를 확인할 수 있었다. 전자현미경 사진을 통하여 케라틴층이 배양된 하이드로젤의 표면과 배양되지 않은 하이드로젤의 표면이 다름을 확인하였으며, 이를 통하여 형성된 케라틴층의 모습을 직접적으로 확인하였다. 앞서 기술한 실험들을 통해 실크 피브로인의 바이오 잉크로 사용 가능성을 확인하였다.

다. 바이오잉크용 소재 사업화

(1) 제품화

본 과제를 통해 개발한 수용성 실크피브로인, 세리신, 광가교 젤라틴, 광가교 실크피브로인을 제품화 하여 2018년 11월부터 판매를 시작하였다.



그림 64. 제품 사진 (수용성 실크피브로인, 세리신, 광가교 젤라틴, 광가교 실크피브로인)

또한, 개발한 제품에 대한 카달로그를 제작하여 홍보에 적극 활용하였다.

SF-WS (Water soluble Silk fibroin)

실크피브로인은 누에고치에서 얻을 수 있는 천연 단백질 물질로, 생체적합성이 우수하고 생체재료로 안전성이 입증된 물질입니다.

실크피브로인은 건조 후 물에 용해될 수 있는 천연 단백질 물질로, 생체적합성이 우수하고 생체재료로 안전성이 입증된 물질입니다.

실크피브로인은 누에고치에서 얻을 수 있는 천연 단백질 물질로, 생체적합성이 우수하고 생체재료로 안전성이 입증된 물질입니다.

실크피브로인은 누에고치에서 얻을 수 있는 천연 단백질 물질로, 생체적합성이 우수하고 생체재료로 안전성이 입증된 물질입니다.

Sericin

Sericin은 누에고치에서 얻을 수 있는 천연 단백질 물질로, 생체적합성이 우수하고 생체재료로 안전성이 입증된 물질입니다.

Sericin은 누에고치에서 얻을 수 있는 천연 단백질 물질로, 생체적합성이 우수하고 생체재료로 안전성이 입증된 물질입니다.

Sericin은 누에고치에서 얻을 수 있는 천연 단백질 물질로, 생체적합성이 우수하고 생체재료로 안전성이 입증된 물질입니다.

Sericin은 누에고치에서 얻을 수 있는 천연 단백질 물질로, 생체적합성이 우수하고 생체재료로 안전성이 입증된 물질입니다.

GelMA (Gelatin Methacrylate)

GelMA는 젤라틴 유래 단백질 유도체로, 빛에 의해 경화 될 수 있도록 구조가 개질된 물질입니다.

GelMA는 젤라틴 유래 단백질 유도체로, 빛에 의해 경화 될 수 있도록 구조가 개질된 물질입니다.

GelMA는 젤라틴 유래 단백질 유도체로, 빛에 의해 경화 될 수 있도록 구조가 개질된 물질입니다.

GelMA는 젤라틴 유래 단백질 유도체로, 빛에 의해 경화 될 수 있도록 구조가 개질된 물질입니다.

SFMA (Silk fibroin Methacrylate)

SFMA는 실크 피브로인 유래 단백질 유도체로, 빛에 의해 경화 될 수 있도록 구조가 개질된 물질입니다.

SFMA는 실크 피브로인 유래 단백질 유도체로, 빛에 의해 경화 될 수 있도록 구조가 개질된 물질입니다.

SFMA는 실크 피브로인 유래 단백질 유도체로, 빛에 의해 경화 될 수 있도록 구조가 개질된 물질입니다.

SFMA는 실크 피브로인 유래 단백질 유도체로, 빛에 의해 경화 될 수 있도록 구조가 개질된 물질입니다.

그림 65. 제품 홍보용 카달로그 사진

(2) 제품홍보

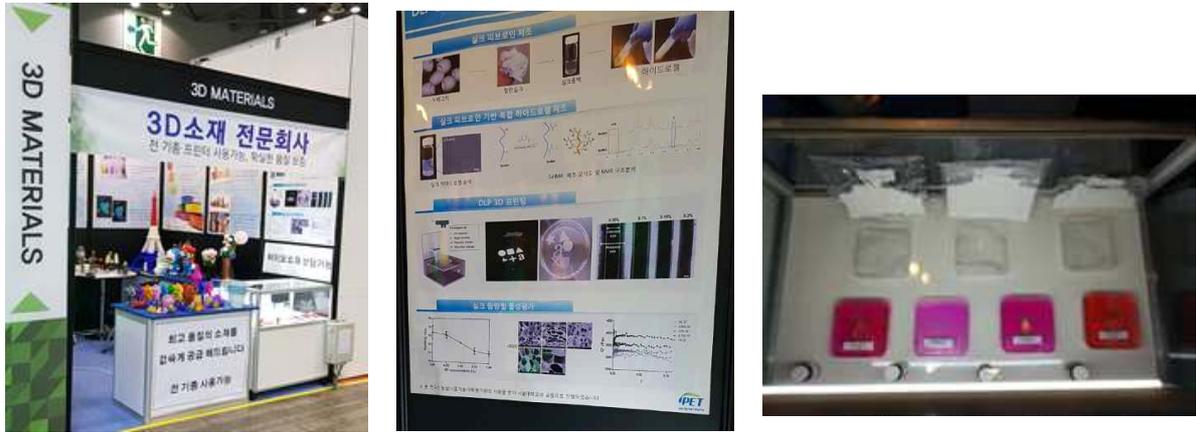


그림 66. Inside 3D printing 전시부스

본 과제를 통해 제품화한 소재를 홍보하기 위해 2018년 총 3번의 전시회에 참석하였다. 2018.06.27.~29일까지 2박 3일간 일산 킨텍스에서 열린 Inside 3D printing 전시회에 참석하여 과제를 통해 개발한 4종의 소재(Silk fibroin-WS, Sericin, GelMA, SFMA)와 DLP프린팅을 통해 출력한 구조체(인공피부, 인공간, 인공코, 인공귀)를 전시홍보하였다.



그림 67. ICEHM 2018 전시부스

2018.11.15.~16일까지 1박2일 동안 고려대학교에서 열린 International Conference on Emerging Healthcare Materials 2018(ICEHM 2018)학회에 전시부스를 운영하여 과제를 통해 개발한 4종의 소재(Silk fibroin-WS, Sericin, GelMA, SFMA)와 DLP프린팅을 통해 출력한 구조체(인공피부, 인공간, 인공코, 인공귀)를 전시홍보하였다.

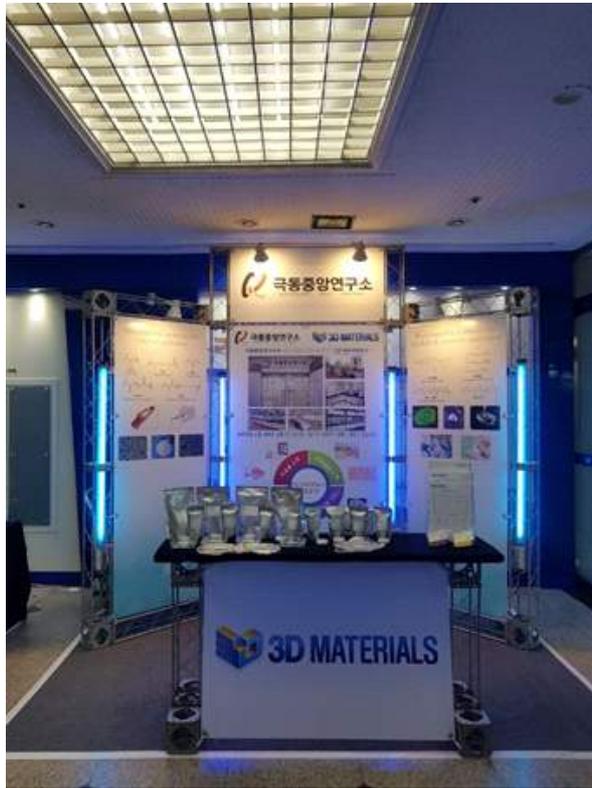


그림 68. 조직공학 교육심포지움 전시부스

2018.11.23. 1일간 가톨릭대학교 성의교정에서 열린 조직공학 교육심포지움에 전시부스를 운영하여 과제를 통해 개발한 4종의 소재(Silk fibroin-WS, Sericin, GelMA, SFMA)와 DLP프린팅을 통해 출력한 구조체(인공피부, 인공간, 인공코, 인공귀)를 전시홍보하였다.

총 3차례에 걸친 홍보를 통해 관련업계 연구원들에게 회사의 제품을 홍보할 수 있는 계기가 되었고, 11월 최초로 매출이 발생하는 성과를 거두었다.

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0.02 억원
			향후 3년간 매출	0.3 억원
		관련제품	개발후 현재까지	0 억원
			향후 3년간 매출	0.1 억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 1 % 국외 : 0 %
			향후 3년간 매출	국내 : 30 % 국외 : 10 %
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 0 % 국외 : 0 %
			향후 3년간 매출	국내 : 10 % 국외 : 5 %
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		5 위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		3 위

라. 연구개발 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍 보		기 타 (타 연 구 활 용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논 문		학 술 발 표	정 책 활 용			홍 보 전 시		
												SCI	비 SCI						논 문 평 균 IF	
단위	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
최종목표	4	3				1	∞		4			4			9	4		0		
1 차 년 도	목 표																			
	실 적														1					
2 차 년 도	목 표	2							1			1			2	1				
	실 적	2							1			1			5	2				
3 차 년 도	목 표	1	1				1		1			2			3	1		0		
	실 적	1	2				4		1			2			6	0		3		
소 계	목 표	3	1				1		2			3		-	6	2		0		
	실 적	3	2				4		2			3		5.9 2	12	2		3		
종료 1차년도	1	1						5				1			2	1				
종료 2차년도		1						10							1	1				
종료 3차년도								30	2											
소 계	1	2					0		2			1			3	2		0		
합 계	4	3				1	∞		4			4			9	4		0		

(가) 국내의 논문 게재

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일	등록번호
1	Effect of solution viscosity on retardation of cell sedimentation in DLP 3D printing of gelatin methacrylate/silk fibroin bioink	Journal of Industrial and Engineering Chemistry	Kyunga Na	61	해외	Journal of Industrial and Engineering Chemistry	SCIE I.F. 4.841	2018	https://doi.org/10.1016/j.jiec.2017.12.032
2	Melanin Nanoparticle-Incorporated Silk Fibroin Hydrogels for the Enhancement of Printing Resolution in 3D-Projection Stereolithography of Poly(ethylene glycol)-Tetraacrylate Bio-ink	APPLIED MATERIALS & INTERFACES	Sungchul Shin	10	해외	APPLIED MATERIALS & INTERFACES	SCI I.F. 8.097	2018	DOI: 10.1021/acsami.8b05963
3	Formation of a keratin layer with silk fibroin-polyethylene glycol composite hydrogel fabricated by digital light processing 3D printing	Journal of Industrial and Engineering Chemistry	Hojung kwak	-	해외	Journal of Industrial and Engineering Chemistry	SCIE I.F. 4.841	2019	https://doi.org/10.1016/j.jiec.2018.12.023

(나) 국내 및 국제학술회의 발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	한국 접착 및 계면학회	신동혁	2016.11.10	한국화학융합 시험연구원	대한민국
2	2017 Nano-bio sensing imaging & spectroscopy	신동혁	2017.02.23	제주 ICC	대한민국
3	Frontiers in polymer science, Fifth international symposium	신성철	2017.05.18	Seville	스페인
4	Biofabrication 2017	신동혁	2017.10.17	북경	중국
5	2017 한국공업화학회 추계학술대회	신동혁	2017.11.09	부산 벅스코	대한민국
6	2017 한국공업화학회 추계학술대회	이현지	2017.11.09	부산 벅스코	대한민국
7	2018 한국공업화학회 춘계 학술대회	곽호정	2018.05.03	대구 엑스코	대한민국
8	18th European Conference On Composite Materials (ECCM)	이현지	2018.06.25	아테네	그리스
9	2018 European Materials Research Society (EMRS) Fall meeting	곽호정	2018.09.18	폴란드	폴란드
10	2018 European Materials Research Society (EMRS) Fall meeting	곽호정	2018.09.18	폴란드	폴란드
11	2018 한국공업화학회 추계 학술대회	이현지	2018.11.02	제주	대한민국
12	2018 한국공업화학회 추계 학술대회	곽호정	2018.11.02	제주	대한민국

(다) 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등 록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	수용성 실크피브로인 제조방법	대한민국	(주)극동중양연구소, 서울대학교 산학협력단	2017.09. 27	10-2017-0 125572	(주)극동중양연구소, 서울대학교 산학협력단	2018.07. 18	10-1881586	100%
2	3D 프린팅용 실크피브로인 구조체의 제조방법	대한민국	(주)극동중양연구소, 서울대학교 산학협력단	2017.09. 27	10-2017-0 125573	(주)극동중양연구소, 서울대학교 산학협력단	2018.07. 18	10-1881587	100%
3	3D 프린팅을 위한 가시광선 경화용 바이오잉크 조성물 및 이의 제조방법	대한민국	서울대학교 산학협력단, (주)극동중양연구소	2018.09. 05	10-2018-0 106130	-	-	-	100%

(라) 전문연구 인력양성

No 1	분류	기준 년도	현 황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	인력양성	2017	1	1	-	-	1	1	2	-	-	-	-

(마) 사업화 현황

No	사업화 방식	사업화 형태	지역	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생년도	기술 수명
							국내	국외		
1	자기실시	신제품개발	국내	제품화	SF-WS 제품화	(주)극동중양연구소	0	0	-	-
2	자기실시	신제품개발	국내	제품화	Sericin 제품화	(주)극동중양연구소	0	0	-	-
3	자기실시	신제품개발	국내	제품화	GelMA 제품화	(주)극동중양연구소	2,160,000원	0	2018	-
4	자기실시	신제품개발	국내	제품화	SFMA 제품화	(주)극동중양연구소	0	0	-	-

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

가. 1차년도 성과목표

- (1) 기개발 바이오잉크 및 바이오프린팅 개발 자료 분석
- (2) 실크 피브로인 정련 공정개발
- (3) 실크 피브로인의 용해공정 개발
- (4) 실크 피브로인의 보관안정성 확보기술 개발
- (5) 실크 피브로인의 기초 물성 자료 및 점도 특성 분석

나. 2차년도 성과목표

- (1) 실크 피브로인 정련 설비 구축 및 공정의 최적화
- (2) 실크 피브로인 복합 바이오잉크 제조 및 특성분석
- (3) 실크 피브로인의 DLP 방식 3D 프린팅 적용 가능성 평가
- (4) 3D 프린터를 이용한 다양한 디자인의 구조체 제조 및 평가

다. 3차년도 성과목표

- (1) 실크 피브로인 기반 바이오잉크의 3D 프린팅 최적화 평가
- (2) 세미스케일업을 통한 실크 피브로인 기반 바이오잉크의 적용성 확대
- (3) 실크 피브로인 바이오잉크의 세포담지능 평가
- (4) 실크 피브로인 바이오잉크를 이용한 세포 공배양 하이드로젤 3D 프린팅
- (5) 다층구조를 가지는 인공피부의 제조
- (6) 실크 피브로인 기반 바이오잉크를 활용한 시제품 제조

마. 주요 성능치 목표

- (1) 정련과정 후 세리신 잔류량 < 1%
- (2) 실크 피브로인의 보관안정성 확보 > 2달
- (3) 파우더화 이후 실크 피브로인 입자크기 < 50 μm
- (4) 실크 피브로인 파우더 재용해도 > 98%
- (5) 세포 생존율 > 90%

라. 최종 성과목표

- (1) 부잡사를 이용한 인공피부 개발용 실크 기반 3D 프린팅 바이오잉크의 개발
- (2) 제조된 실크피브로인 파우더를 3D 프린트 기술에 접목시켜 바이오잉크 및 인공피부 제조

3-2. 목표 달성여부

가. 연차별 성과목표 달성 여부

구분 (연도)	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
1차 년도 (2016)	기개발 바이오 잉크 및 바이오프린팅 개발 자료 분석	실크피브로인을 이용한 바이오 프린팅 관련 문헌조사	FDM 방식을 이용한 프린팅자료는 몇 몇 보고된게 있으나 DLP 방식을 활용 한 자료는 보고된 것이 없음
		DLP 방식을 이용한 바이오프린 팅 재료의 특성 분석	FDM 방식과는 달리 용액의 점도가 낮 아야 하는 특성을 보임
	실크 피브로인 정련공정 개발	정련제로 사용한 sodium oleate, sodium carbonate의 첨가량을 조절하여 잔류 세리신 양을 연 감을 및 표면분석을 통해 분석 하였음	정련제 첨가량이 증가함에 따라 연감 율이 23%에서 30%까지 증가하였음
		정련 시간을 20분에서 80분까지 조절하여 잔류 세리신 양을 연 감을 및 표면분석을 통해 분석 하였음	정련 시간이 20분에서 80분까지 증가 함에 따라 연감율이 25.5%에서 30.2% 까지 증가하였음
	실크 피브로인 용해공정 개발	LiBr의 농도를 3, 6, 9, 12M로 조절하여 실크 피브로인의 용해 특성을 분석하였음	6M 이하의 LiBr 용액에서는 용해가 이 루어지지 않았음, 9M 이상의 LiBr 용 액이 실크피브로인 용해에 적합
	실크 피브로인의 보관안정성 확보기술 개발	알칼리 처리시간 및 수산화나트륨 농도 조절을 통해 가수분해 도를 조절하였음	알칼리 처리시간 및 수산화나트륨 농 도를 조절함에 따라 실크 피브로인 단 백질의 분자량이 감소하는 것을 확인 하였음
		조건에 따라 제조된 실크피브로 인 하이드로겔의 투명도 및 물 성을 평가하였음	가수분해된 실크 피브로인 하이드로겔 의 투명도는 700nm 파장대에서 약 80%까지 증가하였음 가수분해 처리한 실크 피브로인 하이드 로겔의 기계적 강도는 미처리 실크 피 브로인 하이드로겔 대비 약 7% 수준임
		실크피브로인의 보관안정성 및 바이오잉크로의 활용도를 높이 기 위해 동결건조 및 재용해도 를 분석하였음	가수분해된 실크피브로인은 동결 건조 시 2달 이상의 보관안정성을 보임 동결 건조된 실크 피브로인의 경우 98%이상의 재용해 특성을 보임

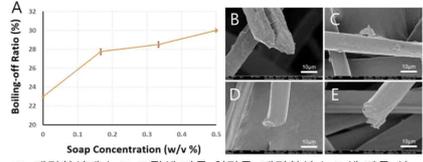
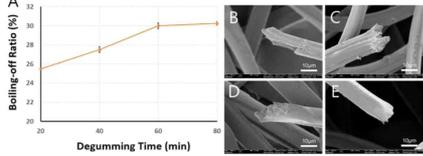
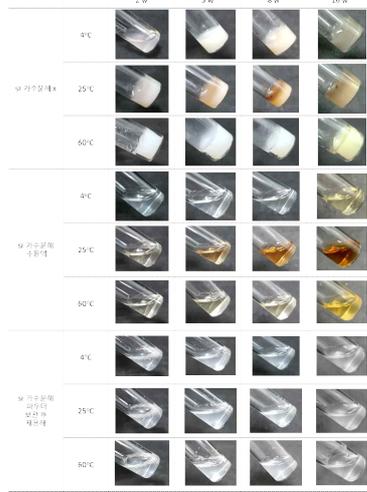
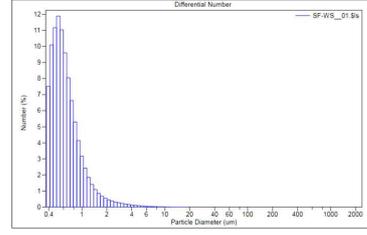
	실크 피브로인 기초물성 분석	실크피브로인 하이드로겔의 광학적 특성 평가를 진행하였음	실크 피브로인 하이드로겔의 경우 500nm 파장대의 광 투과도가 0%로 광 조사를 이용하는 DLP 방식의 바이오 잉크로는 적합하지 않음
		실크피브로인 하이드로겔의 물성을 분석하였음	압축강도 평가 결과 40%의 변형율에서 약 35kPa의 압축강도를 보임 전단변형율에 대한 저장탄성율은 42.3kPa로 나타남
2차년도 (2017)	실크 피브로인 정련 설비 구축 및 공정의 최적화	정련방법 및 용해시약 변경을 통해 대량생산 방안 마련하고 단계별 공정을 대량생산에 최적화 할 수 있는 방법을 연구했음.	물을 이용하여 실크를 정련함으로써, 세리신의 회수가 가능하고, 한번에 1kg에 가까운 대량의 실크를 정련하였음 용해공정에서 Li염류대신 Ca염류를 사용하여, 용해 시간을 단축하고 원재료 원가를 절감하여 대량생산의 효율 향상효과를 얻었음
		실크 피브로인 공정화를 위한 초기 단계의 설비를 구축하여 실크 피브로인 제조 효율을 향상방안을 마련했음.	실크 피브로인 공정화를 위한 전기투석장치와 동결건조설비를 도입하였음 전기투석장치를 활용하여 실크피브로인의 염제거시간 및 비용을 단축했으며, 동결건조시스템을 활용하여 실크 피브로인의 장기간 보관안정성을 확보하였음
	실크 피브로인 복합 바이오 잉크 제조 및 특성 분석	실크 피브로인을 기계적 처리를 통해 파우더 용액을 제조하고 입자를 관찰하였음.	실크 피브로인 파우더는 PBS용액에 잘 분산되어 있으며, 수마이크로 사이즈의 입자를 확인하였음
		젤라틴 메타아크릴아마이드(GelMA)/실크 피브로인의 잉크 제조 및 특성을 분석하였음.	젤라틴에 메타아크릴기를 도입하여 GelMA를 합성하였으며, 90% 이상의 치환률을 보였음 GelMA용액에 실크 피브로인을 첨가함에 따라 점도가 증가하였음

		<p>PGE-tetra-acrylate(PEG4A)/실크 피브로인/멜라닌 잉크 제조 및 특성을 분석하였음.</p>	<p>4-arm-PEG에 아크릴기를 도입하여 PEG4A를 합성하였음 또한 실크피브로인과 멜라닌 복합체 제작하였으며, SEM을 통해 이를 확인하였음 PEG4A에 실크 피브로인을 첨가함에 따라 점도가 증가하였음</p>
<p>실크 피브로인 복합바이오 잉크의 DLP 방식 3D 프린팅 적용 가능성 평가</p>		<p>GelMA와 실크 피브로인 잉크의 겔화 조건을 확립하였음.</p>	<p>물질들의 조합비는 실험을 통하여 10 wt% GelMa, 0.05 mM EosinY, 0.2 wt% TEA와 0.2 wt% NVP의 조건에서 8분 이내에 겔화가 되는 것을 확인하였음 (혼합비에 따른 겔화 시간 비교 필요)</p>
		<p>PEG4A와 실크 피브로/멜라닌 잉크의 겔화 조건을 확립하였음.</p>	<p>물질들의 조합비는 실험을 통하여 4 wt% PEG4A, 5 wt% 실크 피브로인/멜라닌 미세 입자 복합체, 0.1 mM Eosin-Y, 0.3 wt% TEA와 0.3 wt% NVP로 하여3분 이내에 겔화가 되는 것을 확인하였음</p>
		<p>DLP 3D 프린팅 시스템을 구축하고 잉크에 따른 해상도 변화를 확인하였음.</p>	<p>해상도 향상을 위해 실크피브로인/멜라닌 복합체를 사용하였으며, z축으로 200μm의 해상도를 나타내었음. x,y축에 대한 해상도는 복합체 구성비에 따라 변화가 가능하였으며, 50μm 이내로 조절가능함을 확인하였음</p>
		<p>프린트된 하이드로겔의 기계적 강도 및 함수율 세포독성을 평가하였음.</p>	<p>모든 조건의 바이오 잉크에서 Modulus 측정 결과 겔의 특성을 보였으며, 이는 구조체의 물리적 또는 기계적 형상이 유지 될 수 있을 것으로 보임 또한 실크피브로인 함량에 따라 하이드로겔의 물성이 증가하는 경향을 보임 하이드로겔 내에서 세포가 증식하는 것을 확인하였음</p>

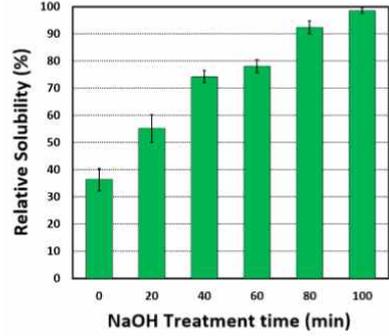
	3D 프린터를 이용한 다양한 디자인의 구조체 제조 및 평가	패턴디자인, 사각관 디자인, 격자 디자인 구조체 제조 후 출력 정밀도를 평가함	PEG4A와 실크 피브로/멜라닌 잉크로 사각관 디자인을 제조했을 때 내부의 공극구조가 잘 프린팅 되었음. 격자구조에서도 폭 500 μ m, 길이 1 cm의 고해상도 프린팅을 구현하였음
3차 년도 (2018)	실크 피브로인 기반 바이오잉크의 3D 프린팅 최적화 평가	GelMA/가수분해 실크피브로인 바이오잉크 최적화 평가	광가교 고분자 물질로 GelMA10%를 사용하여 가수분해 실크피브로인을 1% 농도로 혼합하였을 때 최적의 프린팅 적합성을 나타냄
		GelMA/실크피브로인 입자 바이오잉크 최적화 평가	광가교 고분자 물질로 GelMA 10%를 사용하여 실크피브로인 입자를 1% 농도로 혼합하였을 때 최적의 프린팅 적합성을 나타냄
		실크피브로인-멜라닌 입자 바이오잉크 최적화 평가	실크피브로인 1 wt%, 멜라닌 0.2% 농도일 때 최적의 프린팅 적합성을 나타냄
		실크피브로인-리보플라빈 바이오잉크 최적화 평가	실크피브로인 4 wt%, 리보플라빈 1 mM 농도에서 최적의 프린팅 적합성을 나타냄
		PEG4A/실크피브로인 바이오잉크 최적화 평가	광가교 고분자 물질로 PEG4A를 사용하여 실크피브로인 1 wt%를 혼합하였을 때 최적의 프린팅 적합성을 나타냄
	세미스케일업을 통한 실크 피브로인 기반 바이오잉크의 적용성 확대	광가교 고분자 물질의 대량생산 공정확립을 통해 실크 피브로인 기반 바이오잉크 제조 스케일업	광가교 고분자 물질의 제조 공정개선을 통해 1회 제조 용량 10배 증가, 제조 소요시간 2주이상 단축, 원가 80% 절감하였음. 이를 통해 바이오잉크 제조량을 늘리고 바이오잉크의 적용성을 확대하였음
	실크 피브로인 바이오잉크의 세포담지능 평가	GelMA/실크피브로인 혼합 바이오잉크의 세포담지능 평가를 위해 NIH 3T3 세포를 Calcein AM으로 형광염색하여 실크피브로인 혼합비에 따른 바이오잉크 용액의 세포 분산도 관찰	바이오잉크에 세포를 담지한 후 1시간 뒤 형광현미경을 이용하여 세포 분포를 관찰하였을 때, 실크피브로인을 넣지않은 용액은 5분이내에 세포의 침전이 일어났으며 실크피브로인을 1% 혼합하였을 때 1시간이 지나도 세포가 균질하게 바이오잉크에 섞여있음
	PEG4A/실크피브로인 혼합 바이오잉크에 NIH 3T3세포와	실크피브로인이 없는 PEG4A 단독 하이드로젤은 내부와 표면의 NIH 3T3세	

	HaCaT세포를 배양하여 배양직 후와 7일 뒤 세포를 phalloidin/DAPI로 염색하여 세포담지능 평가	포와 HaCaT 세포가 비정상적인 형태를 보임 PEG4A/실크피브로인 혼합 바이오잉크에서 7일 뒤 세포가 잘 퍼져 하이드로젤에 붙어있는 형태가 된 것을 확인함
실크 피브로인 바이오잉크를 이용한 세포 공배양 하이드로젤 3D 프린팅	PEG4A/실크피브로인 혼합 바이오잉크에 NIH 3T3 세포를 함유하여 DLP 프린팅하고 프린팅된 하이드로젤 표면에 HaCaT 세포를 배양하여 두 세포를 공배양함	PEG4A/실크피브로인 혼합 바이오잉크에서 공배양한 두 세포 모두 정상적인 형태로 하이드로젤에서 부착된 것을 확인함
다층구조를 가지는 인공피부의 제조	PEG4A/실크피브로인 혼합 바이오잉크에 NIH 3T3 세포를 함유하여 DLP 프린팅하고 프린팅된 하이드로젤 표면에 HaCaT 세포를 배양하여 6주간 배양하여 H&E 염색을 통해 인공피부 구조체 제조여부를 평가함	NIH 3T3 세포와 HaCaT 세포를 공배양하여 2주, 6주간 배양했을 때 점차 두껍게 케라틴층이 형성되는 것을 확인함
실크 피브로인 기반 바이오잉크를 활용한 시제품 제조	과제를 통해 공정을 확립한 바이오잉크용 제품화함	실크피브로인, 세리신, 광가교 젤라틴, 광가교 실크피브로인을 제품화함

나. 주요 성능치목표 달성 여부

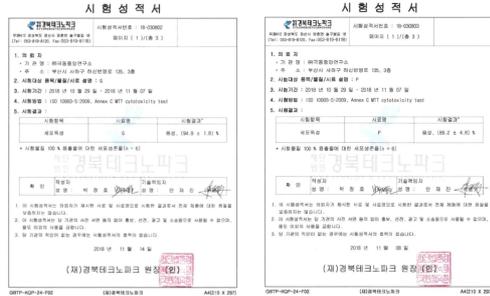
주요 성능치 목표	목표 달성 여부
정련과정 후 세리신 잔류량<1%	 <p>(A) 계면활성제 농도 조절에 따른 연감률. 계면활성제 농도에 따른 실크 섬유 표면의 주 사진자현미경 사진: (B) 0 w/v%, (C) 0.16 w/v%, (D) 0.33 w/v%, (E) 0.5 w/v</p>  <p>(A) 정련 시간에 따른 연감률 비교. 정련 시간에 따른 실크 섬유의 주 사진자 현미경 사진. (B) 20분, (C) 40분, (D) 60분, (E) 80분</p> <p>보통 연감률 25~30%일 때 세리신이 완전히 제거 된 것으로 판단하며, 계면활성제 농도 및 정련시간에 따른 연감률을 비교하고 SEM 이미지로 정련실크의 표면을 관찰하였을 때 세리신이 완전히 제거된 것을 확인하였음</p>
실크 피브로인의 보관안정성 확보>2달	 <p>가수분해 실크피브로인 파우더는 4달이상 보관안정성을 가짐</p>
파우더화 이후 실크 피브로인 입자크기<50 μm	 <p>파우더화 이후 실크 피브로인은 <10 μm 입자 크기를 가짐</p>

실크 피브로인 파우더 재용해도>98%



100분 동안 가수분해한 실크피브로인은 100%에 가까운 재용해도를 가짐

세포 생존율>90%



바이오잉크의 분해산물에 대한 세포독성평가를 하였을 때, 94.9 ± 1.8 %, 89.2 ± 4.8%로 높은 세포 생존율을 보임

다. 최종목표 달성 여부

(1) 부잡사를 이용한 인공피부 개발용 실크 기반 3D 프린팅 바이오잉크의 개발

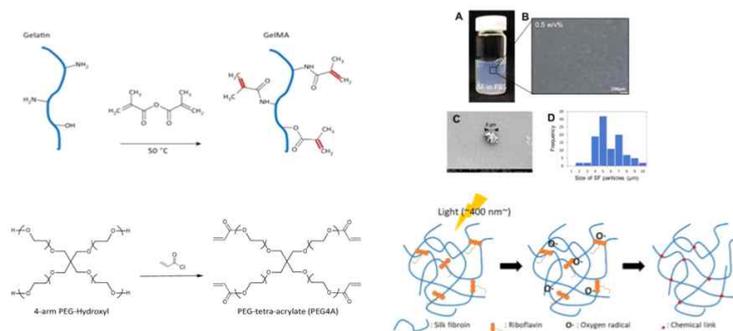


그림 69. 과제를 통해 개발한 3D 프린팅 바이오 잉크

과제를 통해 ① GelMA/가수분해 실크피브로인 함유 복합 바이오잉크, ② GelMA/실크피브로인 입자 함유 복합 바이오잉크, ③ 실크피브로인-멜라닌 입자 함유 복합 바이오잉크, ④ 실크피브로인-리보플라빈 복합 바이오잉크, ⑤ PEG4A/실크피브로인 함유 복합 바이오잉크를 개발하였다.

(2) 제조된 실크피브로인 파우더를 3D 프린트 기술에 접목시켜 바이오잉크 및 인공피부 제조

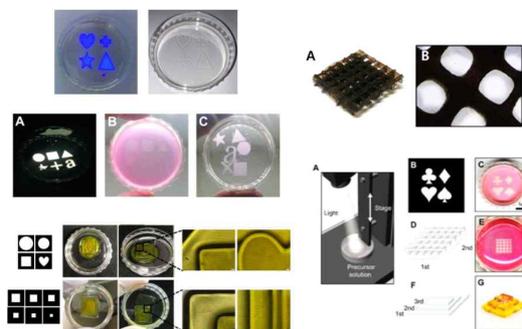


그림 70. 과제를 통해 개발한 바이오잉크의 3D 프린트 기술 접목

과제를 통해 개발한 ① GelMA/가수분해 실크피브로인 함유 복합 바이오잉크, ② GelMA/실크피브로인 입자 함유 복합 바이오잉크, ③ 실크피브로인-멜라닌 입자 함유 복합 바이오잉크, ④ 실크피브로인-리보플라빈 복합 바이오잉크, ⑤ PEG4A/실크피브로인 함유 복합 바이오잉크를 3D 프린트 기술에 접목하여 고해상도의 구조체를 제조하였다.

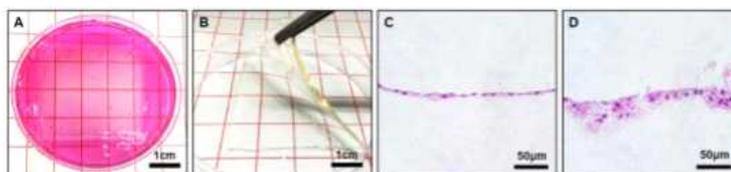


그림 71. 바이오잉크를 활용한 인공피부 구조체 제조

과제를 통해 개발한 PEG4A/실크피브로인 함유 복합 바이오잉크에 NIH 3T3 세포를 혼합하여 DLP 프린팅 한 후 하이드로젤 표면에 HaCaT 세포를 공배양하여 인공피부 구조체를 제조하였다.

4. 연구결과의 활용 계획 등

가. 연구 성과의 활용분야 및 활용방안

실크 피브로인은 누에가 만든 천연고분자로서 세포친화성이 높아 고부가 의료용 소재로 활용도가 높을 것으로 생각된다. 실크 피브로인을 이용하여 창상피복재, 생체적합 봉합사, 실크 피브로인 필름이 코팅된 cell culture wells 등 의료용제품의 제조가 가능할 것으로 기대된다. 적용실험의 용도에 따라 스펀지, 하이드로젤, 필름, 파이버, 파티클 등 다양한 형태로 가공하여 의료용제품 뿐만아니라 조직재생연구, 약물전달 분야에도 응용이 가능할 것으로 생각된다.

세리신은 실크 피브로인을 감싸고 있는 수용성 단백질 물질로, 인체 내에서 면역거부반응을 일으킨다는 보고로 인해 그 사용이 제한적이고 실크의 정련폐액으로 버려지고 있었지만, 최근 세리신 단백질이 피부 천연보습인자와 유사한 구조를 갖는다는 보고가 있을 뒤 화장품 업계에 활용도가 높아졌다. 실크 피브로인 정련 후 얻어진 세리신은 화장품사업에서 활용도가 높을 것으로 생각된다.



그림 72. 3D 바이오프린팅 시장 성장률 전망

광가교 젤라틴 및 광가교 실크 피브로인의 경우 천연 고분자물질로 세포친화성이 우수하고 광개시제와 혼합하여 빛에 의해 광중합이 일어나는 소재로 DLP 3D printing, SLA 3D printing 등 빛을 사용하는 3D 바이오프린팅의 소재로 활용도가 높을 것으로 생각된다. 3D 바이오프린팅의 국내시장은 연평균 40.4%의 빠른 속도로 성장하고 있으며, 세계시장 또한 32.7%라는 높은 성장률을 보이고 있으므로, 본 연구를 통해 개발한 바이오잉크 제품은 우수한 시장성을 가지는 것으로 생각된다. 또한, 본 연구를 통해 개발된 바이오잉크는 기존의 바이오잉크 소재에 실크 피브로인을 혼합하여 개발한 복합바이오잉크로 세포적합성과 물성이 향상되었고 바이오잉크내에 분산된 세포의 침전을 억제하여 균일한 세포의 분산이 가능한 장점이 있다. 이러한 바이오잉크는 DLP 바이오 3D printing 시스템에 적용하여 바이오잉크 단독 또는 단백질 성장인자나 세포를 혼합하여 골조직 재생, 연골분화, 피부조직 모사 등의 실험에 활용가능하다.

인공피부 구조체는 인체의 피부 층을 모사하여, 화장품 화학약품에 대한 피부 민감도나 피부 자극성을 평가할 수 있는 시험재료로 활용 될 수 있다.

나. 추가 연구의 필요성 및 타 연구에의 응용

인공피부 구조체의 보다 정밀한 구조 모사에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 생각되며, 더 나아가 구조체를 모듈화 하여 칩형태로 개발한다면 피부대체용 시험키트로 활용도가 높을 것으로 기대된다.

본 연구개발을 통해 개발된 바이오잉크를 활용하여 인공피부 뿐만 아니라 다양한 인공장기를 제작하기 위한 바이오 잉크 개발의 기초연구로 활용될 것으로 기대된다.

다. 기업화 추진방안

과제의 연구개발을 통해 바이오잉크용 소재 4종에 대한 사업화가 이루어졌다. 파우더형태의 소재 뿐만 아니라 액상의 복합바이오잉크에 대한 사업화도 준비 중에 있다. 파우더형태에 비해 보관안정성이 현저히 떨어져 변성되기 쉬운 문제로 보관안정성을 높이기 위한 첨가제를 혼합하여 제품화할 계획이다.

붙임. 참고문헌

1. KR1020130031194 (누에 실샘 유래 가수분해물의 수득방법)
2. KR102015000131329 (저분자량 실크 조성물 및 안정화 실크 조성물)
3. KR1020140069930 (실크 하이드로겔 조성물 및 실크 하이드로겔 마스크)
4. KR1020160127845 (질산염 첨가를 통해 제조된 실크 피브로인 겔 및 그의 제조방법)
5. KR101750984 (실크 피브로인 골 고정장치의 제조방법 및 그 방법에 의해 제조된 실크 피브로인 골 고정장치)
6. WO2014123761 (Photoactive silk protein and fabrication of silk protein structures using photolithography)
7. US20150165092 (Methods of producing and using silk microfibers)
8. C.S. Ki, et al., *International Journal of Biological Macromolecules* 41 (2007) 346-353.
9. H.H. Kim, et al., *Polymer* 90 (2016) 26-33.
10. A. Matsumoto, et al., *J. Phys. Chem. B* 110 (2006) 21630-21638.
11. S. Nagarkar, et al., *Phys. Chem. Chem. Phys.* 12 (2010) 3834-3844.
12. C. Bettinger, et al., *Biomaterials* 30 (2009) 3050-3057.
13. A. Watt, et al., *Soft Matter* 5 (2009) 3754-3760.
14. R. Kankala, et al., *Biofabrication* 9 (2017) 032002.
15. R. Kankala, et al., *ACS Biomater. Sci. Eng.* 4 (2018) 800-818.
16. F. Melchels, et al., *Biomaterials* 31 (2010) 6121-6130.
17. H. Lin, et al., *Biomaterials* 34 (2013) 331-339.
18. R. Gauvin, et al., *Biomaterials* 33 (2012) 3824-3834.
19. X. Zhao, et al., *Adv. Healthc. Mater* 5 (2016) 108-118.
20. G. Sriram, et al., *Mater. Today* 21 (2018) 326-340.
21. D.N. Rockwood, et al., *Nat. Protoc.* 6 (2011) 1612-1631.
22. Gartner, "Hype Cycle for 3D Printing," 2014.
23. 무역위원회, 한국실크연구원 "견사·견직물 산업 경쟁력 조사" 2011.
24. 생명공학정책연구센터 "조직공학 및 재생 시장 현황 및 전망" 2014.
25. 보건산업기술이전센터 시장정보 Report 28 조직공학/재생의학 시장동향 2013.
26. 견사·견직물 산업 경쟁력 조사 (무역위원회·한국실크연구원). 2011
27. 3D 프린팅, 제3의 산업혁명 주도! 작성자 KOFAC
28. 농림축산식품부 보도자료 (http://www.mafra.go.kr/list.jsp?newsid=155448160§ion_id=b_sec_1&listcnt=5&pageNo=1&year=&group_id=3&menu_id=1125&link_menu_id=&division=B&board_kind=C&board_skin_id=C3&parent_code=3&link_url=&depth=1)
29. Tissue Engineering and Regeneration : Technologies and Global Markets, BCC Research, 2012
30. <http://lewisgroup.seas.harvard.edu/>
31. <http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/>

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.