

117029-3

산업화 전주기
적용위한
OPU 유래
수정란이식
2019

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개(), 발간등록번호(O)

농생명산업기술개발사업 2019년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003140-01

산업화 적용위한 OPU 유래 수정란이식 전주기 관련기술 개발

최종보고서

2020.07.10.

주관연구기관 / 경상대학교
협동연구기관 / 경상남도 축산연구소

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

(전문기관)

<제출문>

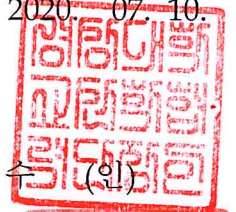
제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

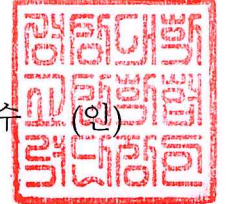
본 보고서를 “산업화 적용위한 OPU유래 수정란 이식 전주기 관련기술 개발”(개발기간 : 2017. 04. 21 ~ 2019. 12. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2020. 07. 10.

주관연구기관명 : 경상대학교 산학협력단 (대표자) 강 상 수 (인)



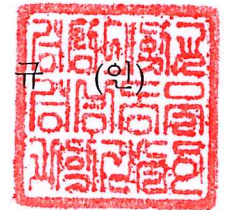
세부연구기관명 : 경상대학교 산학협력단 (대표자) 강 상 수 (인)



협동연구기관명 : 경상남도 축산연구소 (대표자) 이 진 우 (인)



참여기관명 : 경상대학교GAST (대표자) 이 정 규 (인)



주관연구책임자 : 공 일 근

세부연구책임자 : 임 현 태

협동연구책임자 : 이 성 훈

참여기관책임자 : 이 정 규

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	117029-3	총연구기간	2017.04.21. ~ 2019.12.31	단 계 구 분	3/3
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	농생명산업기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	산업화 적용위한 OPU 유래 수정란이식 전주기 관련기술 개발			
	세 부 과 제 명	1세부: OPU유래 수정란의 질적 수준향상 기술개발 2세부: 난포과동주기 활용 OPU 체란효율 향상기술 개발 1협동: 수태율 향상위한 대리모의 사양관리 및 선발기술 개발			
연구책임자	공 일 근	해당단계 참여연구원 수	총: 29 명 내부: 29 명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부:300,000천원 민간:160,000천원 계:460,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 46 명 내부: 46 명 외부: 명	총 연구개발비	정부:900,000천원 민간:480,000천원 계:1,380,000천원
연구기관명 및 소속부서명	주관 : 경상대학교 산학협력단 협동 : 경상남도 축산연구소			참여기업명 경상대학교 GAST	
국제공동연구 위탁연구	상대국명: 연구기관명:			상대국 연구기관명: 연구책임자:	
※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음					
연구개발성과의 보안등급 및 사유					

9대 성과 등록·기탁번호

구분	dx.doi .org/1 0.1016 /j.ther iogeno logy.2 017.05. 012	dx.doi .org/1 0.1016 /j.rep bio.20 17.09.0 02	doi.org /10.10 16/j.th erigen ology.2 017.11. 017	doi:10. 3390/v 100502 43	doi.org/ 10.1155/ 2018/61 21328	doi.org /10.10 71/RD erigen ology.2 019.05. 007	DOI: 10.308 02/A ALAS -J A A LAS-1 8-000 085	doi:10 .3390 /ijms 20122 956	doi.or g/10. 1016/ j.anire prosci .2018. 11.006	doi.or g/10. 1016/ j.anire prosci .2019. 10612 5	doi.or g/10. 12750 /JAR B.34.4 .305
특허	10-201 7-0088 639	10-201 9-0085 129									

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다) 보고서 면수

우량한우 개량위한 OPU유래 수정란의 생산효율 및 수태율 향상을 위한 전주기적 관련기술을 개발하기 위해 본 연구과제를 수행하였다. 무혈청배지 (SPF+ITS+EGF)에서 46.1% 배반포기와 56.4% 임신율을 확보하였음. 저온저장수정란의 이식 후 수태율은 51.9%로서 보온수송 49.7%와 유사하여 수정란이식 적용이 가능하였다. 전사억제인자의 처리에 의한 저온저장 시 6일째까지 96.6% 생존율을 확보하였으나, 부화율이 저조하여 개선의 필요성이 있었다. MMP-2 & -9의 첨가에 의한 자궁외기질 침투능력의 개선되었으며, 소에서는 MMP-9에서 효과가 확인되었다. 동결수정란의 생존율 97.7%, 부화율 73.3%와 45.0% 수태율을 확보하였다. 난포파동에 의한 GVII 난자의 채취효율은 3회 난포파동 공란우로부터 60.3%로서 2회 46.6%보다 유의적으로 높았다. 보호베타카로틴제제를 급여하여 번식률이 70%로 높았고, 급여 후 수태율이 11.0-15.85%의 개선효과를 보였다.

109 페이지

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 연구개발의 목적 및 필요성 <ul style="list-style-type: none"> ● 난포파동주기 이용한 GVII단계 미성숙난자 채취하여 OPU유래 수정란 생산효율 향상기술 개발 ● 수정란이식의 산업화 적용을 위한 OPU유래 수정란이식 관련 전주기 관련기술, 즉 수정란생산, 수송/공급/저장, 이식 및 수태율 향상 관련기술 개발 ● 대리모의 혈액대사물질기반 선발기준 정립 및 베타카로틴 급여체계 확립으로 수태율 향상기술 개발 ● 이러한 기술개발로 단기간에 우량한우 대량 확보로 지속 가능 및 고부가가치 창출 가능한 한우산업 실현 ✓ 연구개발 내용 및 범위 <ul style="list-style-type: none"> ● 난포파동주기 이용한 GVII 단계 미성숙난자 채취하여 OPU유래 수정란 생산효율 향상기술 개발 1. 난포파동주기를 이용한 GVII stage 난자의 채취효율을 높여 이식 가능한 배반포기배의 생산효율을 기존의 OPU session 당 약 3개에서 8개로 높임(기존 OPU session 당 배반포 수 약 3개→약 8개) 2. 적정 채취시기의 판단을 위해서는 개체별 난포파동의 주기를 관찰하고 이를 기반으로 채취시기를 결정하는 기술 개발(초음파에 의한 난포파동주기 관찰에 의한 2, 3파동주기 결정) 3. 주 2회의 채취에서 7-11일에 1회 채취함으로써 공란우에 대한 스트레스의 경감과 1회당 이식 가능한 배반포의 생산율을 높여 OPU 유래 수정란의 생산효율 향상기술 개발 ● OPU유래 수정란생산, 수송/공급/저장 및 이식 관련기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> 1. 무혈청배지의 개발로 수정란의 질적 수준 향상으로 수정란 생산효율 극대화 - 배반포 발달율(기존 30%→60% 이상)을 확보함으로써 혈청에 의한 부정적인 영향을 완전히 제거하고 무혈청에 배지에 의한 수정란의 질적 수준 향상, 즉 세포수의 증가, apoptosis 세포수의 감소, 착상관련 유전자발현의 증가 등의 결과를 확보 - 혈청첨가배지 유래 수정란이식에 의한 거대태아에 의한 난산 및 사산의 위험성을 격감시킬 수 있음 2. 저온저장용 배지의 개발로 저온 및 CO2 incubator 장기저장 기술 개발 - 저온 장기저장(기존 약 3일→4일 이상), CO2 incubator 장기저장(7일 이상) 기술 개발하여 자연발정우 대리모에 신선란 이식이 가능함으로써 발정동기화의 소요비용, 노동력, 스트레스 및 공태기간 단축 등에 의한 경제적 이익을 개선할 수 있는 수정란이식체계 개발 - 신선란의 장점을 충분히 활용함으로써 수태율 향상에 기여 3. 영양막세포의 자궁외기질 침투력 강화로 수태율 향상기술 개발 - 단백질분해효소의 co-transfer로 자궁외기질에 수정란의 침투력을 강화시켜 수태율 향상기술을 개발 - 영양막배엽 세포수의 증가 및 기능 강화로 체외에서 long term culture에 의한 in vitro assay 시스템 구축 4. 동결수정란의 생산효율 개선 - 동결수정란 생산 효율(기존 약 80%→99% 이상)을 높여 수정란의 세포질 내에 지방축적을 줄이고 mtDNA 기능을 강화하는 배양기술 개발 - 동결수정란을 자연발정우에 이식함으로써 발정동기화 생략으로 공태기간 단축하여 수정란이식산업 활성화 5. 수정란이식기술의 개선에 의한 수태율의 향상 - 수정란이식에 의한 수태율 개선(신선란 60% 이상, 동결란 50% 이상)으로 개량
------------------------	---

	<p>효율의 극대화 달성</p> <ul style="list-style-type: none"> - 장기저장기술 유래 동결수정란의 산업화 적용으로 발정동기화 생략 및 수정란 이식 비용의 절감으로 수정란이식이 개량기술로 정착과 동시에 개량효율의 극대화 및 국가적인 개량방법의 페러다임의 변화 ● 대리모의 혈액대사물질 기반 선발기준 정립 및 베타카로틴 이용으로 수태율 향상기술 개발 <ol style="list-style-type: none"> 1. 수정란 이식능가의 수태우와 미수태우 간의 혈중 대사물질 조사로 대리모선발 기준 정립 <ul style="list-style-type: none"> - 혈중 대사물질의 조사로 수태와 관련되는 대사물질을 탐색하여 수태지표를 발굴 - 대리모의 선발을 위한 객관적인 자료를 제시하고, 적정 참고치를 설정 - 특히, 임신유지 및 배아생존에 관여하는 베타카로틴의 혈중 수준의 실태조사 2. 보호 및 비보호 처리된 베타카로틴의 반추위안정성 조사 및 대리모급여 시험을 통한 적정형태 구명 <ul style="list-style-type: none"> - 농가 관행 비보호처리 베타카로틴과 보호처리 베타카로틴의 반추위내 안정성 규명(in vitro) - 대리모에 대한 급여시험을 통한 적정 베타카로틴 급여형태 구명(사양시험 I) 3. 수태율 향상을 위한 베타카로틴 최적급여수준결정을 위한 사양시험연구 <ul style="list-style-type: none"> - 사양시험 I 에서 도출된 결과를 토대로 개발제품의 적정 급여수준 구명(사양시험 II) - 혈중 베타카로틴농도에 의한 적정 사료급여수준 결정 및 수태율 조사
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● 무혈청배지 배양체계 구축 및 수정란 생산기술 개발 - 무혈청배지(SOF+ITS+ EGF) 기반의 배양체계를 개발하여 배반포발생율과 총세포수의 유의적인 증가, 지질함량의 저하, mtDNA 함량의 증가를 확인 - SOF 배지를 기반으로 하는 무혈청배지에 ITS를 첨가하여 OPU유래 수정란의 효율적인 생산기술을 개발하여 혈청 및 무혈청유래 수정란 생산효율을 분석한 결과 배반포 발달율에서는 혈청그룹(35.7%)에 비하여 무혈청 그룹(46.1%)이 높은 것을 확인함 - 생산된 수정란을 대리모에게 이식한 결과 혈청그룹은 135두(54.7%)에서 무혈청 그룹은 47개(56.40%)에서 임신을 확인하였으며, 수정란 생산 및 이식의 현장적용이 가능한 것으로 판단됨 ● 수정란의 저온저장 기반기술 확보 및 수정란이식 현장적용기술 확립 - 보온수송 및 저온저장에 의한 저온수송에 의한 수정란이식의 현장적용은 각각 185두와 68두를 현장 이식 실시하여 49.7%와 51.9% 수태율을 확인하였음 - 수송방법에 의한 수태율은 차이가 없었으며 실제 현장적용이 가능하다는 것을 확인 - 보온수송과 저온수송 간의 수태율이 유의적으로 차이가 나지 않음을 확인 - 저온수송의 장점인 3일 이상의 사용을 통하여 최대 주 6회 이상의 수정란 공급이 가능하여 시간적 공간적 한계성을 극복 할 수 있는 것으로 판단. ● 전사억제인자 조절에 의한 수정란저장 기반기술 확보 - 전사억제인자 조절함으로써 수정란의 저온저장 기간을 획기적으로 연장시킬 수 있는 기술을 개발 목표 - 6일까지 처리하였을 시 96.6% 생존율을 확보하였으나, 그 이상의 저온저장 기간의 연장에서는 생존율이 급격히 감소하고 부화율이 낮은 결과를 보여 기술개발이 요구됨 - 생쥐 수정란에 적용하여 이식 후 수태율까지 확인한 결과 신선란에 비해 임신율에서는 신선란과 차이가 없었으나, 산자생산률과 임신기간에서는 신선란과 유의적인 차이를 보였음

- 수정란의 자궁외기질 침투능력 체외분석기법 및 기반기술 확립(생쥐, 소)
 - In vitro invasion 분석에서 100 ng/ml MMP-2 & -9 첨가 시 영막막배엽의 침투능력이 유의적으로 증가함을 확인
 - 임신율은 MMP-9 첨가구에서 높았고, 산자생산율도 MMP-2 & -9 처리구에서 대조군에 비해 유의적으로 높음
 - 단백질 발현율은 부착된 수정란에서 MMP-9이 유의적으로 높게 발현 확인하였고, MMP-9이 초기착상과정에서 유의적 높은 영향을 미칠 수 있음을 간접적인 결과로 예측
- 동결수정란 생산효율 개선 및 수정란 이식기술의 개선에 의한 수태율 향상
 - 수정란 이식의 궁극적인 목표는 인공수정과 같이 시간적 공간적 제약을 해소하는데 있음
 - 동결수정란의 exp BL에서 생존율(100%)과 부화율(81.2%)이 극대화 결과 확보하였고, 기존 동결방식에 비해 생존율은 84.5%에서 97.7%, 부화율은 58.0%에서 73.3%로 개선함
 - 동결수정란의 현장 이식하여 신선란 52.0%에 비하여 동결란 45.0%으로 약간 낮았으나, 본 연구에서 목표로 한 50%에 근접한 결과를 확보함
- 연구용 공란우 선발 및 질병검사 우 입식
 - 공란우 선발은 자체보유 4두를 포함 경남 축산시험장 4두를 임대하여 총 8두를 1차 선발하였으며, 기준은 4대 질병(브루셀라, 우결핵, 요네병, 구제역 면역형성)에 문제가 없으면서 번식기관, 특히 난소의 발육상태가 우수한 6두를 최종 선발 활용하였음
- 난포과동주기별 채취난자의 GV단계 분석 및 OPU 수정란 생산효율 비교분석
 - 3회 난포과동 공란우로 부터 GVII 난자의 채취효율은 약 60.3%로서 2회 난포과동의 46.6%보다 유의적으로 높았음
 - 3회 난포과동 공란우의 수정란 생산효율은 33.4%, 2회 난포과동 주기의 27.2%보다 유의적으로 높았음
- 수태군과 미수태군간의 혈액대사물질 비교분석
 - 105두의 통계분석 결과, 수태우와 미수태우 간에 혈중 총콜레스테롤 및 glucose가 유의한 차이를 나타내고, 참고치는 각각 99-118 및 63-67 mg/dL로 나타났음
 - β -carotene농도는 두 그룹간 차이가 나타나지 않았으나, 사료급여방식 및 조사료원에 따라 큰 차이가 나타나, 볏짚위주의 급여방식은 가임암소에 적합하지 않은 것으로 조사되었고, 전반적으로 외국의 권장수준에 미흡한 것으로 나타남
- 보호 및 비보호처리 베타카로틴 반추위내 안정성 검증
 - β -carotene이 retinol로 전변된다 하더라도, 혈중 retinol수준은 대조구 수준보다 낮거나 비슷한 수준인 것으로 조사됨
 - In vitro 반추위 pH 결과에서 대조구 (비보호 β -carotene)가 처리구 (보호 β -carotene)보다 유의하게 낮게 나타나, 처리구가 덜 분해되는 것을 간접적으로 시사하였음
- 기존 및 개발 보호처리 베타카로틴의 대리모의 사양연구(I)
 - PBC 및 PBCA구간에 통계적인 차이 없이 각각 132 및 133 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 으로 나타남
 - 수태율은 시판제품(비보호) 급여구가 20.65%, 개발 보호베타카로틴 급여구가 28.72%로 비보호구에 비하면, 8%증가하였으나 통계적인 유의성은 나타나지 않았으며, 혈중 베타카로틴농도는 각각 38.07 및 82.43 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 로 비보호보다 높았음
 - β -carotene농도는 베타카로틴 급여수준이 증가함에 따라 유의하게 높았고, 1.5

	<p>mg/L 이상으로 높게 나타나 반추위 비분해 베타카로틴이 양호한 장내 흡수상태를 확인하였음</p> <ul style="list-style-type: none"> - 보호베타카로틴제제를 번식우에 급여한 결과, 번식률이 70%로 높았으며, 급여 후 수태율이 11.0~15.85%의 개선효과를 나타냄 - 수태당 수정횟수가 급여구에서 2내지 2.2회로 수정횟수를 비급여구보다 0.7내지 0.9회 줄였으며 이는 수정비용 절감효과를 감소할 수 있으며 번식률개선과 수정횟수 감소로 장기적으로 한우 암소의 분만간격과 공태기간을 단축시킬 수 있을 것으로 판단됨 - 수정란이식은 다양한 요인(수정란품질, 수란우의 생식기상태, 시술자의 숙련도 및 사양환경 등)이 상존하기에 베타카로틴 급여에 따른 효과를 나타내기 위해서는 보다 많은 두수가 필요할 것으로 사료됨 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 연구개발의 결과는 우량한우의 개량기술로 산업화 적용기술로 활용하고자 한다. 그 방안으로서 경남한우의 개량기술로 활용하여 경남한우의 10%까지 개량을 목표로 경상남도 축산연구소시험장과 공동으로 추진. ○ 참여기업인 경상대학교의 GAST(경남동물과학기술)에 기술이전을 실시하여 기존 OPU유래 우량한우 수정란의 생산 및 공급에 적용하여 그 효율성을 제고하여 관련 단위지자체, 단위축협 등의 개량을 위해 산업화에 활용. ○ 국내 OPU유래 수정란생산 및 공급에 관련된 연구소, 기관 및 개인기업체 연구소 등에 개발된 기술들을 기술이전, 보급 및 licensing 확대하여 적정화 수준의 기술을 적용함으로써 수정란의 질적 수준을 높여 궁극적으로 전국의 우량한우개량에 기여. ○ 동결수정란을 이용한 수정란이식기술을 산업화에 성공함으로써 신선란의 활용시 공간적, 시간적 한계에서 벗어나 전국을 상대로 개량기술을 적용할 수 있을 것이다. 그리하여 개량효율을 극대화시켜 지속 가능하고 고부가가치를 창출할 수 있는 한우산업으로 발전하는데 기여. ○ 수정란이식 전/후 사양관리체계 가이드라인 제시 및 대리모 선발위한 혈중지표물질의 결정 및 참고치의 설정은 대리모 선발의 객관적인 기준이 될 수 있을 것임. 또한 농가의 무분별한 관행사육으로 고가로 시술된 수정란이 사멸되는 것을 줄일 수 있음. ○ 대리모의 수정란이식 전후 베타카로틴의 적용기술 및 신제품 개발은 번식우의 사양관리의 농가수준의 체계화가 가능하고, 경남 도 사업에 참여시군의 수정란이식 농가에 우선적으로 관리기술을 전파할 계획. ○ 한우 임신우 전용 보호 베타카로틴을 대량생산하여 산업화에 활용. 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>우량한우</p>	<p>OPU유래 수정란</p>	<p>무혈청 배양체계</p>	<p>수정란 장기저장 및 동결보존</p>	<p>수태율</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>Elite cow</p>	<p>OPU derived embryo</p>	<p>No serum culture system</p>	<p>Embryo storage and cryopreservation</p>	<p>Pregnant efficiency</p>

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	9
2. 국내외 기술개발 현황	13
3. 연구수행 내용 및 결과	17
4. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	87
5. 연구결과의 활용 계획 등	98
붙임. 참고 문헌	105

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

제 1장 연구개발과제의 개요

1 절. 연구개발의 필요성

○ 국내 한우산업의 경쟁력 강화 필요성:

2016년 말 현재 국내의 최고기시장에서 한우최고기의 자급율은 약 8.1%(농경연, 2016)로서 수입육에 절대적인 점유율을 빼앗기고 있다. 고급육 시장에서도 해외 수입육 점유율이 가파르게 증가하고 있는 현실에서 한우산업의 경쟁력 확보방안은 시급한 과제로 판단된다. 2016년 국내 한우도축우의 등급비율을 보면 1++(A, B, C 포함)은 8.24%(32,564두-2016년 한해 총 도축량 393,952두)로서 개량의 필요성이 매우 높다. 즉 1등급의 경우 이익이 거의 없는 경영구조로서 한우농가의 어려움은 더욱더 가중되고 있는 것이다. 현재의 1++ 비율을 2배인 16% 정도까지 증가시킬 수 있다면 한우사육농가에서 추가적으로 얻게 될 부가가치는 엄청난 수치에 이를 것이다. 이러한 어려움을 단기간에 해결하기 위해서는 우량한우의 대량생산을 조기에 달성할 수 있는 수정란이식기술의 적용이 반드시 필요하다.

○ 산업화 적용기술의 확립으로 개량속도의 가속화 필요성:

국내의 다양한 연구소, 대학, 개인기업 등에서 수정란이식 관련한 연구개발과 산업화 적용을 하고 있으나 그 기술수준이 낮고, 적정화가 이루어지지 않고 있어 국가적으로 수정란이식에 의한 한우개량을 수행하지 못하고 있는 실정이다. 적정화를 이루지 못한 수준의 기술로 산업화 적용의 시도는 농가의 엄청난 피해를 수반할 수밖에 없다. 왜냐하면 공태기간의 증가(1개월 공태기간 증가는 최소 30만 원 이상 손실)와 비용지출로 농가에서 느끼는 수정란이식기술에 의한 개량에 대한 부정적인 이미지 등을 고려할 때 이의 적정화 기술개발은 너무나 시급하게 요구되고 있는 기술이다. 이러한 수정란이식 관련기술의 적정화로 개량속도의 가속화를 이룰 시 농가의 개량효율 증대뿐만 아니라 농가소득의 증가로 이어져 지속 가능한 한우산업의 발전과 경쟁력있는 한우산업으로의 성장이 가능할 것이다.

○ 정부차원 R&D 지원의 필요성:

개량의 필요성은 이미 확인이 되었다. 개량없이 고급육의 생산은 분명한 한계가 있다. 그러나 현재 국가적인 R&D와 사업비 등의 지원은 너무나 미약하고 당장 농가에서 엄청나게 요구하고 있는 개량에 관련된 지원은 또한 너무나 적은 수준이다. 이러한 상황에서 예산구조가 취약한 단위지자체, 단위축협에서 일부 시행하고 있는 수준으로는 언 발에 오줌누기로 규모가 너무 작아 농가의 요구를 절대적으로 충족시킬 수 없는 수준이다. 관련 연구과제의 경우도 현재 한우농가에서 필요로 하는 연구과제에 집중할 필요성이 있음에도 불구하고 너무나 요원한 수준으로 이루어지고 있다고 판단된다. 이러한 관점에서 과감한 연구개발과제의 지원으로 어려움에 처해있는 한우농가의 경쟁력 확보에 기여할 수 있는 기회가 있어야 할 것이다.

○ 경제/산업적인 측면에서 경남 한우산업의 청사진으로 예상하면 연구개발 완료 후 연구개발성과를 적용했을 시 얻을 수 있는 이익금의 규모는 약 150억원(경남 총 한우두수 28만두, 가임암소 약 10만두, 그중 10% 이식 및 우량한우 생산은 약 5천두/년, 두당 300만원 추가 순이익 받

생 = 5,000두 x 300만원)의 추가 순이익을 확보할 수 있음으로서 그 어떠한 사업에 견주어 결코 뒤지지 않을 것이다. 국가적으로 개량을 방지할 것이 아니라, 농가와 단위지자체, 단위축협에 미루어 놓을 것이 아니라 적극적인 개입과 지원으로 한우산업 전체의 발전에 기여할 수 있는 방안을 찾아야 할 것이다.

1. 기술적 측면

○ 우량한우의 개량으로 한우산업의 경쟁력 확보 필요성:

국내의 한우산업은 세계적인 자유무역체계에 의한 개방화로 조속한 경쟁력 확보 필요성이 대두되어 왔으나, 개량기술개발의 어려움과 연구개발비의 투자 저조, 기술개발과 산업화에 요구되는 소요시간의 장기간, 농가와 관련산업체 및 국가단위에서의 개량 필요성의 인식부족으로 개량관련 기술개발 속도와 수준이 상대적으로 낮았다. 그러나 근래에 들어 OPU유래 수정란이식의 기술개발로 어느 정도의 수태율과 후대의 개량효율 등이 증명되면서 개량의 필요성과 욕구가 강하게 표출되고 있다. 그러나 산업화 적용단계에서 효율성 확보는 참여농가 및 지자체 등의 지속적인 관심과 인식전환에 매우 필요한 요소이다. 실제 현재의 시스템에서는 신선란위주의 이식에서는 모든 대리모는 발정동기화 유도로 비용지출 및 공태기간의 장기화 등으로 농가의 부담이 높다. 또한 이식 후 수태율의 적정수준은 농가의 의지를 충족시키고 우량한우의 대량생산으로 실질적인 농가소득으로 귀속되기 위해서는 반드시 수정란이식의 관련 전주기 기술개발에 의한 적정화가 요구된다.

○ 수정란이식의 산업화 적용을 위한 수정란생산 및 이식의 전주기 관련기술의 적정화:

개량효율의 극대화를 위해서는 수정란이식의 장점은 이미 잘 알려져 있다. 그러나 그 효율성은 다양한 수준으로서 수정란생산 및 이식에 관련된 기술의 적정화가 이루어지지 않고 있는 실정이다. 이와 관련된 기술의 산업화 적용을 위한 수정란이식 관련 전주기 적정화 기술수준으로 개발 필요성이 있다. 즉 고능력 한우로부터 난포파동주기에 따른 GVII단계 OPU유래 난자 채취기술의 효율화, 수정란의 질적 수준을 높일 수 있는 배양체계, 이식을 위한 수정란의 저장 [저온(Ideta 등, 2013) 및 CO₂ incubator] 및 동결수정란 생산, 수태율 향상을 위한 대리모의 선발과 관리체계의 개선으로 수태율을 높여 농가의 실질적인 소득을 증가시키고, 국가적인 개량체계를 확립하는 수정란이식의 전주기 관련기술을 개발할 필요성이 크게 대두되고 있다.

○ 수정란이식의 전주기 관련기술 개발 모식도(그림 1-1):

산업화 적용을 위한 효율적인 수정란 생산 및 이식기술의 개발을 위한 단계별, 전주기별 개발이 필요한 기술들을 그림 1-1과 같다. 각 단계별 다양한 기술이 접목되어 최종산물인 우량 송아지를 분만할 수 있음으로서 모든 단계, 기술들의 수준을 적정화 시킬 필요성이 대두된다. 산업화를 위해서는 최종적인 임신율 및 분만율의 적정화를 이루지 못하면 절대 성공하지 못할 것이다. 그래서 현재의 국내, 특히 본 연구팀의 수준을 제시하고 연구과제 완료 시 기술수준의 목표치를 제시하였다. 세계적인 수준과 차이를 없애고 leading 그룹으로서의 위치를 확보하기 위한 수준으로 발전시키고자 한다.

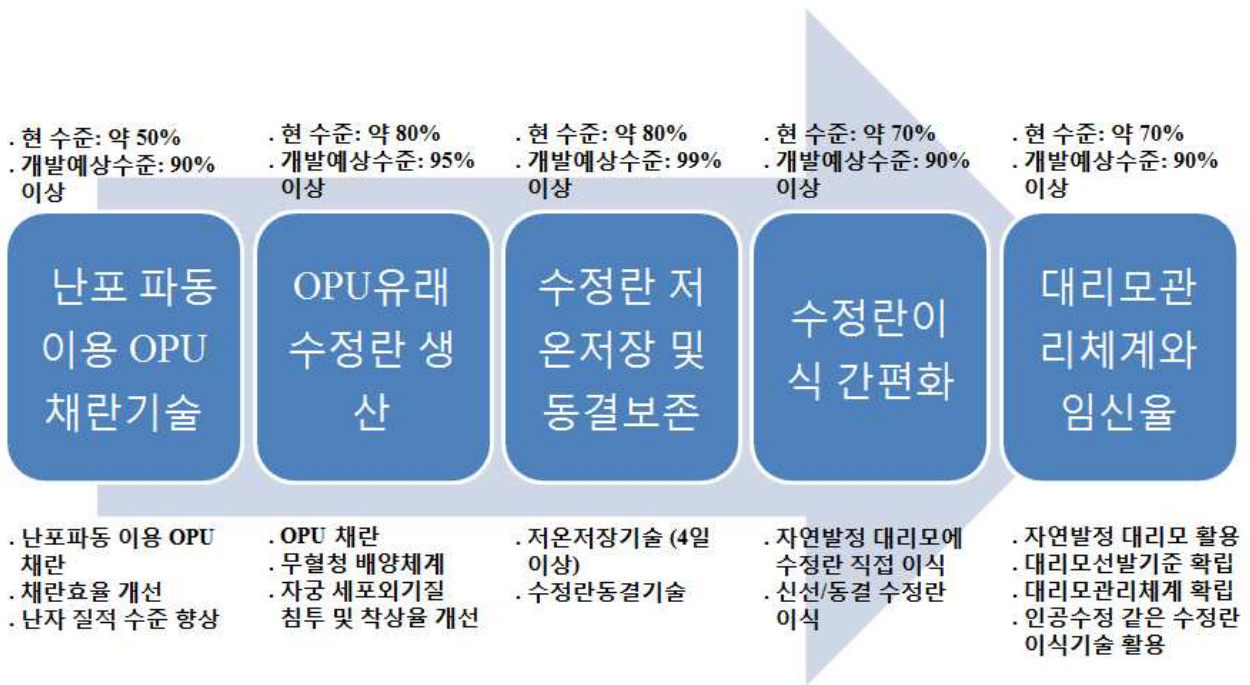


그림 1-1. 연구개발의 개요.

○ 수정란이식기술의 개선:

수정란의 영양막세포에서 발현되는 단백질분해효소 발현량은 자궁내 세포외기질을 용해하면서 착상에 큰 영향을 미친다. 수정란이식 시 이를 co-transfer함으로써 초기 착상율을 높일 수 있다. 이의 검정을 위해 수정란의 생산체계 따른 단백질분해효소의 발현량과 co-transfer 시 착상율을 in vitro long term culture system과 체내이식 후 수태율의 상관관계를 비교분석하여 최선의 수태율 향상방안을 찾고자 함. 발정동기화 필요성을 없앨 수 있는 저온 및 CO₂ incubator 저장과 동결수정란의 이식방법의 개발은 대리모의 공태기간의 단축, 발정동기화위한 노동력과 추가 비용, 몇 번에 걸친 호르몬 주사제에 의한 대리모의 스트레스 등의 필요성을 제거해 버릴 수 있는 기술로서 수정란이식의 편리성을 도모함과 동시에 산업화에 반드시 필요한 기술을 개발하고자 함.

○ 수란우 사양체계 개선에 의한 수태율 향상:

현재 수정란이식을 위한 대리모 선발은 BCS, 배란 후 황체 수준, 자궁 등의 번식기관의 상태와 농가의 사양체계의 점검 등을 평가하여 실시됨. 그러나 현장에서의 사육환경과 농가별 수준 차이 및 개체별 차이 등으로 대리모 선발기준의 엄격한 적용기준의 필요성이 대두되었음. 가장 타당한 선발조건을 개발하여 수정란이식 대상의 대리모 사양관리 및 선발조건을 엄격하게 적용하여 수태율이 인공수정 수준을 얻을 수 있는 기술개발이 필요함.

○ 수정란이식 개량효율의 경제성 분석과 산업화 체계 구축:

이식으로 출생한 우량한우의 비육출하 등급 및 가격을 비교분석하여 실제 개량에 의한 경제성을 분석함으로써 번식개량기술의 적용이 우량한우 대량생산을 위한 기술로 접목한 산업화 가능성을 분석하고자 함. 이러한 기반위에서 단위지자체, 광역지자체 및 국가단위의 개량기술로 적용 가능성을 확인하고자 함.

○ 참고문헌

- . Ideta A. et al., A simple medium enables bovine embryos to be held for seven days at 4°C. Scientific Reports. 2016; 3:1173.
- . Nivet AL et al. FSH withdrawal improves developmental competence of oocytes in the bovine model. Reproduction. 2012; 143:165-171.

2. 경제·산업적 측면

○ 산업화 적용의 핵심기술 개발 및 적용:

- . 난포과동주기 이용한 OPU유래 미성숙난자 채란효율 향상기술 개발: 1차 난포과동의 적정시기에 GVII단계의 난자채취로 OPU유래 수정란의 생산효율 극대화 기술을 개발하고자 한다. FSH 처리에 의한 GVII단계 난자의 채취효율을 높이는 방법은 보고되었으나(Nivet 등, 2012) 실제 산업화에서는 호르몬 영향, 비용, 스트레스 및 반복적 채란 한계성 등의 문제점이 있다. 이를 극복하기 위해서는 자연적인 난포과동주기를 이용하여 GVII단계의 난자채취효율을 높여 이식 가능한 배반포배의 생산효율을 높이고자 함.
 - . 수정란의 질적 수준을 향상시킨 생산기술의 개발: 비혈청 배양액을 기반으로 다양한 성장인자의 조합으로 개선시킬 수 있으며, 또한 영양막세포의 수준을 높여 자궁외기질의 침투력을 높여 수태율을 높일 수 있는 배양체계를 개발하고자 함.
 - . 수정란의 장기간 저장 및 동결수정란 생산기술 개발: 저온 및 CO₂ incubator에서의 장기간 저장과 동결수정란의 생산기술개발로 자연발정우에 직접 이식 가능한 체계를 구축함으로써 발정 동기화에 요구되는 비용의 절감과 공태기간을 단축시켜 수정란이식 비용의 절감시킴으로써 산업화 적용에 반드시 요구되는 기술을 개발하고자 함.
 - . 대리모의 사양관리체계 확립: 수태율에 영향을 미치는 요인 중 농가의 지도가 필요한 부분이며, 적정화 기술개발이 가장 어려운 과제 중의 하나임. 하지만, 대리모의 선발기준의 모델을 제시하고 농가에서 대리모의 사양관리기준을 제시함으로써 수태율을 향상시킬 수 있는 방법을 찾고자 함.
- 본 연구에 활용될 핵심기술은 난포과동주기 이용한 OPU유래 GV2단계 난자채취, OPU유래 수정란생산위한 무혈청배양체계, 저온/CO₂ incubator 저장기술, 동결보존기술, 단백질분해효소 co-transfer에 의한 수태율 향상 기술 등이다.

제 2장 국내외 기술개발 현황

1절. 국내기술개발현황

○ 기술현황

- 수정란이식에 의한 개량은 당대에 개량을 완성할 수 있기에 개량효율 및 속도를 높일 수 있는 매우 효과적인 기술이기에 국내외 많은 연구소, 대학, 각 도의 축산시험장, 개인기업체 등에서 실시하고 있다. 그러나 대부분 도축장유래 난소로부터 난자를 채취하여 수정란을 생산 공급하는 경우가 많을 뿐만 아니라 근친의 위험성, 친자감정의 한계성 등으로 수정란이식의 본래 개량의 의미가 많이 퇴색될 수 있다. 또한 과배란처리에 의한 체내수정란의 생산 및 공급은 수정란의 생산효율의 한계가 있다.
- 이러한 한계점을 극복하고 수정란의 생산효율을 높일 수 있는 OPU유래 수정란생산기술의 개발과 산업화 기술수준으로의 개발은 본 연구팀에서 정립하였다(Ghanem N 등, 2016; Jin 등, 2016). 현재 많은 연구소 및 연구실에서 이러한 기술을 도입하기 위해 노력하고 있으며, 관련기술들의 적정수준까지 도달은 극복해야 할 많은 난관이 있다. 즉 적정화 수준의 기술을 구사하여 수정란의 질적 수준을 높여 이식 후 수태율의 확보까지는 한계가 있을 뿐만 아니라 전주기의 수정란생산 및 이식기술의 수준에는 미치지 못하고 있는 현실이다. 그리하여 본 연구과제에서 OPU유래 수정란의 효율적인 생산과 이식 후 수태율의 안정적 성적을 얻기위한 OPU유래 수정란생산 및 이식 전주기 관련기술의 개발하고자 한다.
- 대리모의 사양관리체계는 대부분의 경우 농가관행에 의해 사육되고 있는 실정으로, 수정란이식 후 수태율 저하의 한 요인으로 평가되고 있다. 또한 많은 연구자들에 의해 고급육생산을 위한 비육우 중심의 사양관리체계에 관한 연구가 다년간 수행되어 왔으나, 번식우에 대한 사양관리 기술은 외국의 알려진 기술에 의존하거나 비육우에 비하여 등한시된 부분이 있고 이에 체계적인 번식우 사양 관리체계 확립을 위한 실질적인 가이드라인을 제시하고자 한다.

○ 시장현황

- 고능력 한우의 개량을 위한 한우농가의 욕구가 매우 높고 각 지자체 및 단위축협별로 이러한 개량기술을 이용한 개량에 많은 관심을 가지고 있다. 그러나 한우농가나 단위지자체 및 축협에서 원하는 수준의 수태율을 기대치에 미치지 못하고 있다. 또한 도축장유래 체외수정란을 이식함으로써 농가의 불신이 높아져 개량에 매우 효과적인 수정란이식의 인식을 나쁘게 하는 것에 대한 열려 또한 있는 실정이다. 그럼에도 불구하고 우량한우의 개량수요는 폭발적으로 증가할 것으로 예상된다. 현재 전국적으로 OPU 유래 수정란 생산 및 공급되는 물량은 약 5,000개 이하로 판단되어 미미한 수준이나, 도축장 유래 수정란의 생산 및 공급 물량은 약 10,000개에 이를 것으로 예측된다. 왜냐하면 현재 이와 같은 데이터가 전혀 보고되지 않고 있는 실정이고, 한국축육개량협회에서 발행되는 수정란증명서의 발급건수로는 2016년 현재 약 10,000여건이었다. 수정란의 생산 및 공급에 의한 시장은 현재의 수준(약 10,000개 straw = 약 15억원; 20만원 x 5,000 straw = 10억원, 10만원 x 5,000 straw = 5억)에서 한우 사육두수 중 가임암소의 약 10% 정도를 예상하면 약 10만개 straw(약 150억원)의 규모로 확대될 것으로 판단된다. 즉 현재의 수정란생산 및 공급에서 규모에서 10배 이상의 시장규모로 증가할 것이다.

. 우량한우의 개량에 의한 시장현황은 현재 거의 보고된 바가 없다. 그러나 본 연구팀에서 우량한우의 수정란이식에 의하여 생산된 산자들의 비육출하 성적을 기반으로 정리하면 다음과 같다. 2016년에 M시에서의 도축물량을 근거로 취합한 데이터를 분석한 결과 1+이상(1+, 1++)의 비율이 84.3%는 인공수정유래 전국의 도축물량 대비 약 45.5% 증가했다. 도체중은 1++에서 50 kg, 1+에서 47.5 kg의 증가를 볼 수 있었다. 이와 같이 OPU유래 수정란이식에 의한 한우생산은 등급뿐만 아니라 도체중의 증가로 순이익의 증가가 두드러지게 높다는 것을 확인할 수 있었다. 즉 OPU유래 수정란이식은 우수한 유전자원의 확보와 그들로부터 얻어질 수 있는 elite 한우의 생산 측면에서 매우 큰 경쟁력을 분명하게 보여주고 있다.

○ 경쟁기관현황

. 국내에서 수정란을 생산공급 기관과 개인기업체는 4-5곳 정도로 파악되고 있다. 그러나 각자 수정란의 생산방법과 공급체계가 구별될 수 있다. 즉 OPU유래 수정란, 과배란유래 수정란, 도축장유래 수정란 등으로 차별화가 되고있고, OPU유래 수정란의 수요가 폭발적으로 증가하고 있어 많은 기관, 연구소 및 개인기업체에서 OPU유래 수정란의 생산체계를 도입하고자 하고 있다. 그러나 이 또한 국가적인 개량측면에서 고려되어야 할 부분은 수정란의 질적 수준의 균일성 및 적정 수준 이상의 질적 수준이 반드시 필요하다. 왜냐하면 궁극적으로 수태율이 받쳐주지 못하면 그 피해는 한우사육농가에 돌아갈 수밖에 없는 현실이기 때문이다.

. 이러한 의미에서 OPU유래 수정란의 생산, 공급 및 이식 후 수태율까지의 전주기 관련기술의 표준화 및 균일화가 반드시 요구되는 것이다. 한 기업체, 연구기관의 독점이 아니라 국가적인 개량의 의미를 가지고 이의 효율성을 높일 수 있는 기술개발과 적정기술의 공유가 반드시 필요한 것이다.

○ 지식재산권현황

. 본 연구팀에서 수정란생산 및 이식과정에서 반드시 요구되는 수정란배양 관련 특허출원 1건(국내특허 10-2016-0161480)과 수정란동결기술에 관련된 국내특허등록 2건(국내특허 10-1510946, 국내특허 10-1509295)을 확보하고 있고, 이와 관련된 연구과제 수행과정에서 개발될 기술들을 특허출원하여 향후 기술이전 등으로 산업화 적용에 활용될 수 있도록 할 것이다. 현재 관련 특허를 확보하고 있으나 효율향상과 적정화 기술개발을 위한 연구개발이 요구된다. 또한 임실군농업기술센터에서 수정란 이식기술을 이용한 고능력 한우의 대량생산방법(등록번호: 1013905360000)가 확인되었다.

○ 표준화현황

. 수정란생산, 공급 및 이식에 관한 표준화는 전혀 이루어지지 않고 있다. 그래서 수정란의 질적 수준에 차이가 존재하고 특히 OPU 유래 수정란의 생산기술은 더욱더 이러한 표준화가 시급히 요구되고 있다. 보다 효율적이고 표준화된 기술력을 확보하여 전국적인 개량기술로 활용할 수 있도록 표준화기술개발이 요구된다.

. 우량한우의 개량을 위해서는 가장 효과적인 기술이 OPU 유래 수정란의 생산 및 이식이다. 이러한 기반기술의 적정화를 이루고 이를 관련 연구실 및 개인기업체 등과 공유하면서 국내의 수정란이식 산업에 적용한다면 우량한우의 번식개량기술로 활용과 함께 전국적인 개량효율 개선으로 우량한우집단의 확대와 농가의 소득향상으로 지속 가능한 한우산업으로 발전할 수 있을 것이다.

○ 참고문헌

- . Ghanem N et al., The anti-Mullerian hormone profile cannot predict recipient receptivity but is linked with the in vitro embryo production capacity and embryo quality after transfer. *Reproduction in Domestic Animals*. 2016; 51:301-310.
- . Jin et al., Interaction of donor age, parity and repeated recovery of cumulus-oocyte complexes by ovum pick-up on in vitro embryo production and viability after transfer. *Livestock Science*. 2016; 188:43-47.

2절. 국외기술개발현황

- . 외국 특히 남미 및 일본에서 수정란이식에 의한 개량기술의 활용에 선두적인 역할을 하고 있다. 가장 효율적인 OPU유래 수정란 생산 및 이식은 남미, 즉 아르헨티나, 브라질에서 매우 폭발적으로 증가하고 있으면서 세계를 선도해 나가고 있다. 비육우의 개량에 이러한 기술적용이 개량효율에 엄청난 효율을 보여주고 있기에 이와 관련된 기술개발 및 적용이 매우 높다고 판단된다. 일본에서도 관련기술을 이용한 화우의 개량 및 증식에 적극적으로 활용하고 있다. 우리나라의 전반적인 OPU유래 수정란생산 및 이식기술과의 수준은 선진국의 약 80% 수준정도로 평가된다.

- . 난포파동을 이용한 GVII 난자 채취기술은 Sirard 그룹(Nivet et al., 2012; *Reproduction*)에 의한 FSH 처리 후 54시간째에 채란이 가장 효율적이라는 보고를 하였음. 그러나 본 연구과제에서는 호르몬처리 없이 자연난포파동주기를 이용한 채란기술을 개발하고자 함.

○ 시장현황

- . 세계적인 수정란 생산 및 공급물량은 2016년 IETS News letter를 기준으로 수정란 생산량은 2014년 2,037,111개에서 2015년 2,279,737로 12% 증가 했으며, OPU의 경우 2014년도 590,035에서 2015년 612,709로 3.8% 증가하였으나 주로 아메리카(총 94.69%, 북미 24.34%, 남미 70.35%)의 증가폭(남미 12.58%, 북미 5.32%)으로 생산량이 증가하였다. 그러나 유독 우리나라는 거의 정체된 상황으로서 수정란이식에 의한 개량의 적극적 활용이 매우 필요한 시점이라고 판단된다. 왜냐하면 암/수의 유전능력을 동시에 활용한 수정란이식이기에 당대에 개량이 완성되기 때문이다.

○ 경쟁기관현황

- . 수정란이식분야에서는 세계적인 경쟁관계를 논하기에는 문제가 있다. 국내의 유전인자, 즉 한우의 수정란을 수출할 수 있는 방법이 없기 때문이다. 기술적인 수준에서 논한다면 전반적인 수준이 선진국의 약 80% 수준으로 약 20% 갭이 수태율에 미치는 영향은 매우 크다. 즉 그 피해가 공태기간으로, 수정란이식 비용의 증가로 이어져 수정란이식에 대한 인식이 부정적으로 변하는 계기가 되는 것이다. 본 연구에서 개발된 기술력을 이용해서 고능력 젖소의 수정란을 중국시장에 판매는 가능할 것으로 판단된다. 왜냐하면 중국의 경제력이 증가하면서 우유 및 유제품의 수요가 폭발적으로 증가하여 고능력 젖소의 수요가 많다. 이러한 것은 향후 대중국수출을 타겟으로 한 기술개발과 사업개척이 필요하다고 판단된다.

○ 지식재산권현황

- . 수정란 생산 및 이식에 관련된 지식재산권의 행사는 국제적으로 거의 활용가치가 없다고 판단

된다. 수정란 생산관련 기반기술은 일반화되어있고 그 과정, 즉 전주기 관련기술을 활성화할 때, 국내의 한우에 직접 적용하는 것은 불가능하다. 왜냐하면 한우의 경우 유전자원(수정란, 정액)의 수출이 불가하기에 국내의 한우개량에만 초점을 맞춰야하기 때문이다.

○ 표준화현황

- . 수정란 생산 및 이식에 관련된 기술의 표준화 또한 요원한 것으로 판단된다. 실험실별, 과학자별로 각자의 특색을 가지고 있고 실재 know-how는 거의 공개되지 않고 있다. 그리하여 연구실별 생산되는 수정란의 질적 수준이 다르고 이를 이식 후 수태율 또한 다르게 보고되고 있다.

제 3장 연구개발 수행 내용 및 결과

1절. 1차년도 세부연구수행 결과

1. <1세부(경상대학교) : OPU유래 수정란의 질적 수준 분석 및 이식 적용기술 확립>

○ 무혈청배지 배양체계 구축

본 연구실에서는 무혈청배지 배양체계를 구축하기 위하여 SOF 기본배지에 여러 가지 성장인자를 혼합하여 최적의 배양 방법을 구축하고자 하였다. 결과는 Table 1과 같다.

Table 1. Cleavage, developmental, and hatching rates of embryos cultured in different media.

Group	Total no. of oocytes*	No. of presumed zygotes	No. of cleaved embryos (% ± SEM)	Total no. of blastocysts (% ± SEM)**	No. of hatched blastocysts (% ± SEM)**
SOF+ITS+EGF	303	285	246 (86.24 ± 0.64)a	118 (41.42 ± 0.86)a	52 (43.76 ± 2.46)a
SOF+FBS	288	265	211 (80.00 ± 1.69)b	100 (37.28 ± 1.41)b	25 (25.71 ± 1.46)b
SOF+ITS	266	250	203 (81.12 ± 1.98)b	90 (36.00 ± 0.47)b	23 (25.52 ± 2.09)b
SOF+EGF	335	313	249 (80.25 ± 1.60)b	98 (31.28 ± 0.89)c	27 (27.73 ± 2.03)b
SOF	253	232	186 (79.86 ± 1.60)b	56 (24.70 ± 1.61)d	5 (8.82 ± 2.66)c

^{a-d} Values with different superscripts in the same column are significantly different ($P < 0.05$).

* Six replicates were performed.

** Rates are relative to the number of presumed zygotes.

SOF 기본배지에 다양한 성장인자, 즉 ITS, EGF 및 FBS를 조합하여 배양한 결과 ‘SOF+ITS+EGF’ 처리구에서 다른 처리구에 비해 유의적으로 높은 분화율, 배반포발달율 및 부화율을 보였다 (86.24 ± 0.64, 41.42 ± 0.86, 43.76 ± 2.46) ($P < 0.05$). 이러한 결과는 혈청이 첨가된 배양조건에 비하여 무혈청배지(‘SOF+ITS+EGF’) 조건에서와 같이 적절한 성장인자의 조합에 의한 배양조건이 배발달율과 부화율에 크게 기여한다는 것을 보여주고 있다. 즉 체외배양 시 반드시 혈청을 기반으로 한 배지를 사용할 필요없이 무혈청의 배양조건에서 더욱 더 건강하고 질적으로 우수한 수정란을 생산할 수 있다는 것을 확인하였다. 이렇게 생산된 수정란의 질적수준을 검정하기 위한 다양한 분석을 아래와 같이 수행하였다.

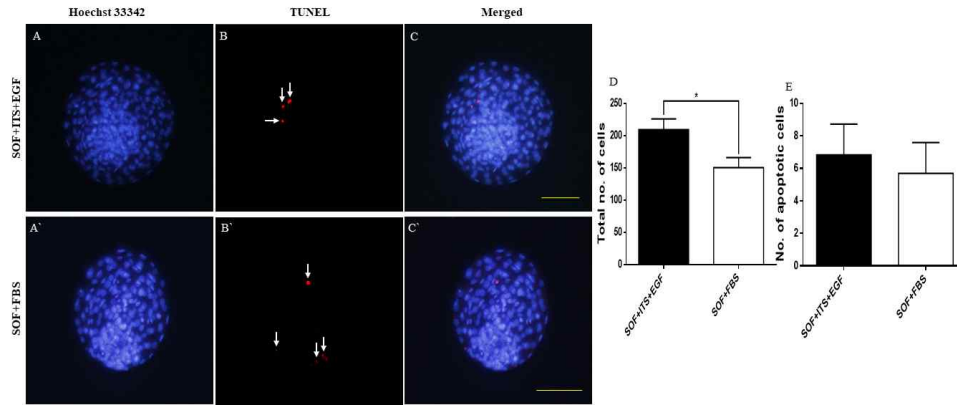


Fig. 1. Day 8 bovine embryos were stained with Hoechst 33342 to determine the total cell number, and TUNEL was performed to identify apoptotic cells. The corresponding images were merged. Embryos were cultured in the (A-C) SOF+ITS+EGF and (A'-C') SOF+FBS groups. Scale bar, 100 μ m. Apoptotic cells are indicated by white arrows. (D) Mean total cell numbers determined by Hoechst 33342 staining. (E) Mean total apoptotic cell numbers determined by TUNEL. The asterisk indicates a significant difference ($P < 0.05$).

Table 2. Total cell number and numbers of TE and ICM cells in embryos cultured in different media.

Group	Total cell no.	No. of TE cells	No. of ICM cells	ICM:TE cell ratio
SOF+ITS+EGF	210.08 \pm 4.26 ^a	156.67 \pm 6.59 ^a	53.42 \pm 5.72 ^a	0.36 \pm 0.06 ^a
SOF+FBS	169.67 \pm 7.40 ^b	129.56 \pm 4.42 ^b	40.11 \pm 3.63 ^a	0.31 \pm 0.02 ^a

^{a,b} Values with different superscripts in the same column are significantly different ($P < 0.05$).

SOF+ITS+EGF 무혈청 배양조건에서 생산된 수정란의 질적수준을 비교하기 위해 SOF+FBS 처리구 수정란의 총 할구 수 및 사멸세포수를 비교한 결과를 Table 2, Fig. 1에서 제시하고 있다. 즉 SOF+ITS+EGF 무혈청 배양조건 유래 수정란에서 총 세포수는 SOF+FBS 처리구에 비해 유의적으로 높았고(210.08 \pm 4.26 vs. 169.67 \pm 7.40), 사멸세포 수는 반대로 유의적으로 낮게 형성되었음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 혈청이 첨가된 배지보다는 ITS와 EGF 성장인자가 첨가된 무혈청배지에서 생산된 수정란의 질적 수준이 높다는 것을 확인할 수 있었다.

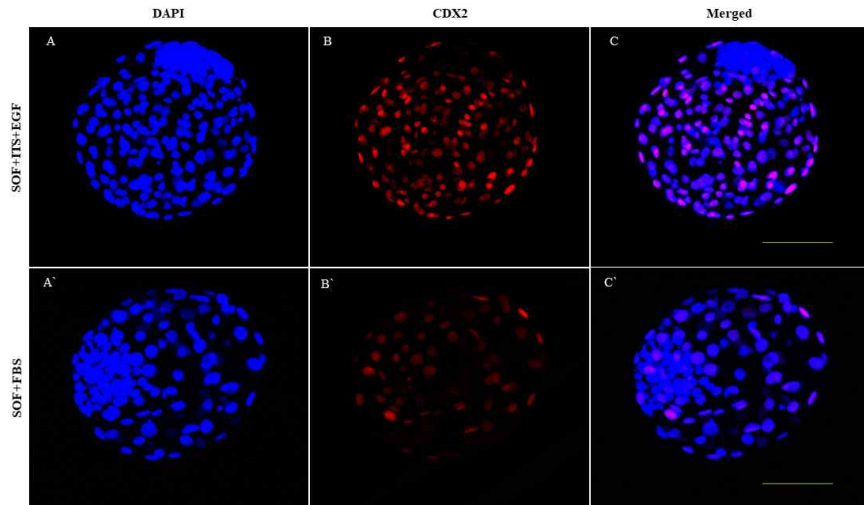


Fig. 2. Immunofluorescence staining of day 8 blastocysts showing CDX2 protein (red) localized in the TE. Nuclei were stained blue with DAPI. Embryos were cultured in the (A-C) SOF+ITS+EGF and (A'-C') SOF+FBS groups. Images were taken with a confocal microscope. Scale bar, 100 μ m.

또 다른 수정란의 질적수준을 비교분석하기 위해서 유전자발현을 2처리구, 즉 SOF+ITS+EGF와 SOF+FBS 처리구에서 수정란발생에 중요한 기능을 하는 CDX2 protein 발현량을 비교분석한 결과는 Fig. 2에서 보는 바와 같다. 즉 SOF+ITS+EGF 무혈청처리구에서 유의적으로 높은 발현량을 확인할 수 있었다. 이는 수정란의 질적수준이 SOF+FBS 처리구 유래 수정란보다 유의적으로 높음을 확인할 수 있는 결과이다.

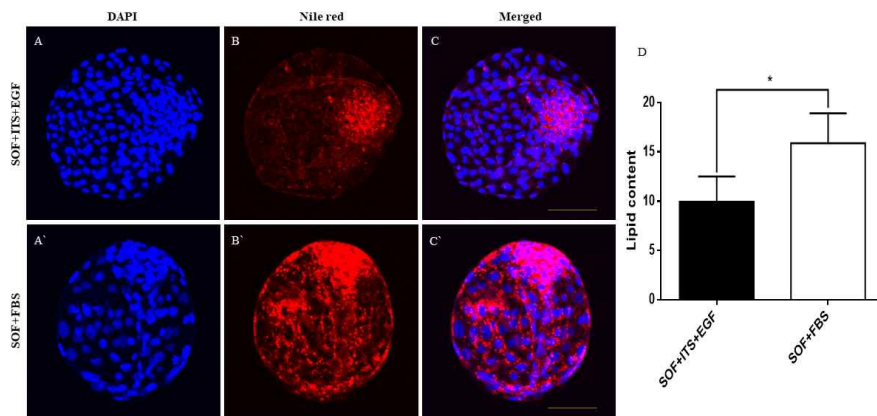


Fig. 3. Fluorescence intensity of lipid staining in day 8 blastocysts. NR staining of day 8 blastocysts in the (A-C) SOF+ITS+EGF and (A'-C') SOF+FBS groups. Scale bar, 100 μ m. (C) Mean values of the integrated optical density of lipid staining per blastocyst as analyzed by ImageJ software. The asterisk indicates a significant difference ($P < 0.05$).

배양조건에 따른 지질성분의 함량비교를 위해 Nile red 염색을 실시하여 수정란 내에 지질성분의 함량을 분석한 결과 SOF+ITS+EGF 처리구에서 SOF+FBS 처리구에 비해 유의적으로 낮은 결과를 확인할 수 있었다 (Fig. 3). 이러한 결과는 궁극적으로 수정란의 동결보존에 긍정적인 영향을 미칠 수 있다. 즉 지질성분은 동결수정란의 동결 및 용해과정에서 결빙형성 및 재

결빙에 부정적인 영향을 끼쳐 동결수정란의 생존성과 부화율에 나쁜 영향을 미치게될 뿐만 아니라 이러한 과정에서 저온충격 등에 매우 민감하게 반응하게 함으로써 궁극적으로 수정란의 생존율을 낮게 할 수 있다.

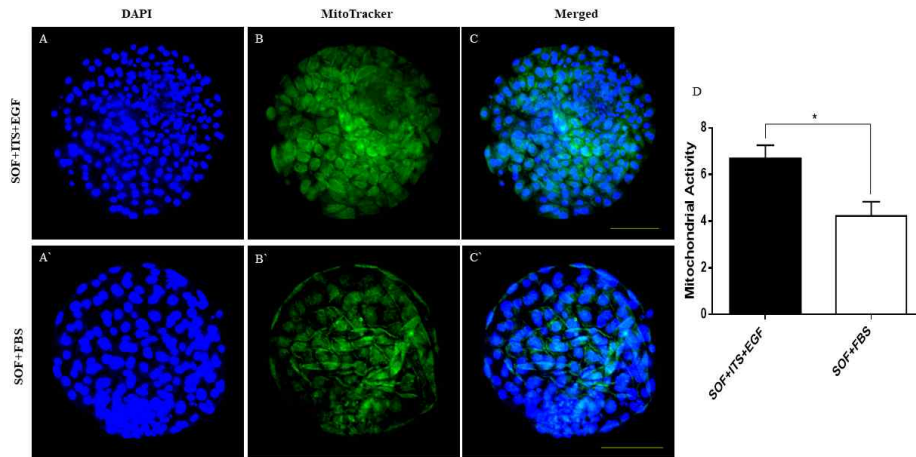


Fig. 4. Fluorescence intensity of mitochondrial staining in blastocysts. MitoTracker Green staining of day 8 blastocysts in the (A-C) SOF+ITS+EGF and (A'-C') SOF+FBS groups. (D) Mean values of the integrated optical density of mitochondrial staining per blastocyst. The asterisk indicates a significant difference ($P < 0.05$).

배양조건에 따른 mitochondria 함량을 비교분석한 결과 무혈청배지 수정란이 유의적으로 높은 함량을 보였다 (Fig. 4). 즉 이러한 결과는 무혈청의 배양조건이 수정란의 질적수준 향상에 크게 기여하고 있음을 확인할 수 있고, 본 연구팀에서 개발한 배양조건, SOF+ITS+EGF 무혈청배양액의 조합이 매우 효과적이라는 것을 검정하였다.

또한 배양조건에 따른 동결수정란의 용해 후 24시간째 생존율 및 부화율을 확인한 결과 (Fig. 5) SOF+ITS+EGF 처리구에서 SOF+FBS 처리구에 비해 유의적으로 높은 생존율과 부화율을 보였다. 이러한 결과는 위에서 언급한 무혈청배지 유래 수정란의 지질성분의 감소와 mtDNA 량의 증가 등이 궁극적으로 생존율과 부화율의 향상에 기여한 것으로 판단된다.

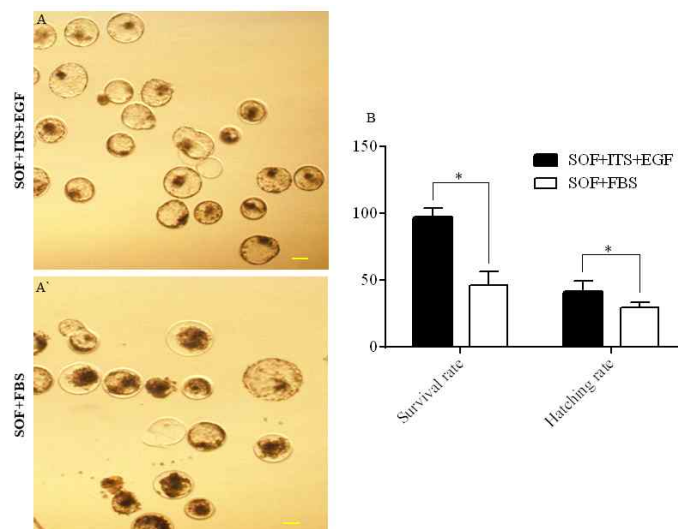


Fig. 5. Survival and hatching rates of embryos at 24 h after thawing. Bright field images showing the survival and hatching rates in the (A) SOF+ITS+EGF and (A') SOF+FBS groups. (B) Mean values of the survival and hatching rates. The asterisk indicates a significant difference ($P < 0.05$).

수정란의 배양조건이 착상을 간접적으로 확인해 볼 수 있는 침투능력 및 이동능력을 비교 분석한 결과 (Fig. 6) 무혈청배지(SOF+ITS+EGF) 유래 수정란이 혈청배지(SOF+FBS)유래 수정란보다 유의적으로 높은 능력을 보였다. 이것은 체내 이식 시 수정란의 영양배엽이 자궁내막에 침투능력을 간접적인 비교분석이 가능하기에 수태능력이 유의적으로 높을 것으로 예상된다.

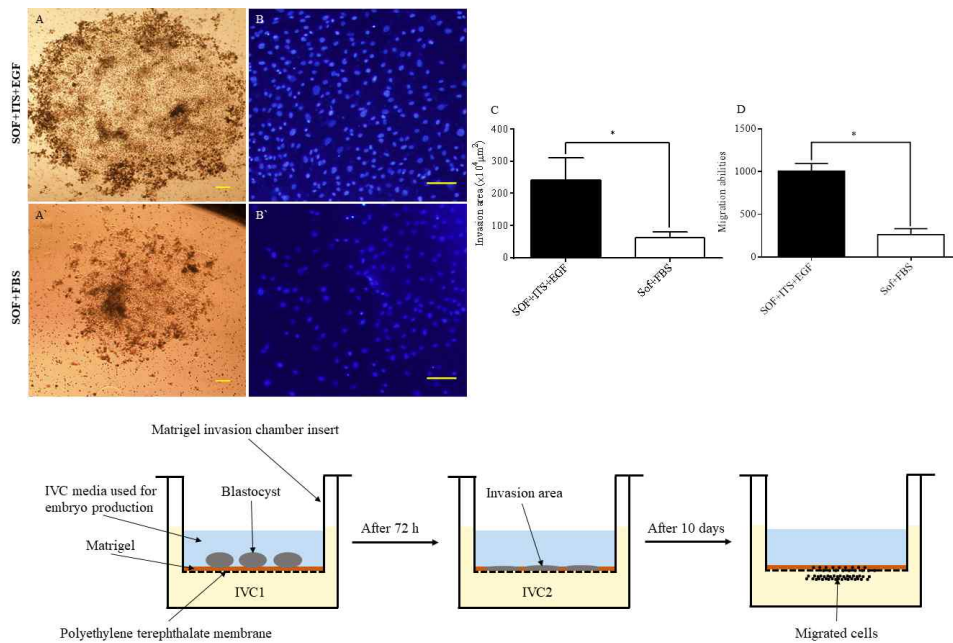


Fig 6. Invasion and migration abilities of trophoblasts. Bright field images showing the invasion area in the (A) SOF+ITS+EGF and (A') SOF+FBS groups. Migrated cells stained with Hoechst 33342 in the (B) SOF+ITS+EGF and (B') SOF+FBS groups. Scale bar, 100 μ m. (C) Mean invasion areas. (D) Mean numbers of migrated cells. The asterisk indicates a significant difference ($P < 0.05$).

수정란의 질적수준을 비교해 볼 수 있는 다양한 유전자(MMP-2, -9, ACADL, ACSL3, HMGCR, IGF2R 및 SIRT1, SOD2, TFAM, BCL2) 발현율은 유의적으로 높았으며, 세포사멸 관련 유전자(BAX)의 발현율은 유의적으로 낮아져 수정란의 질적 수준을 비교분석할 수 있다 (Fig. 7).

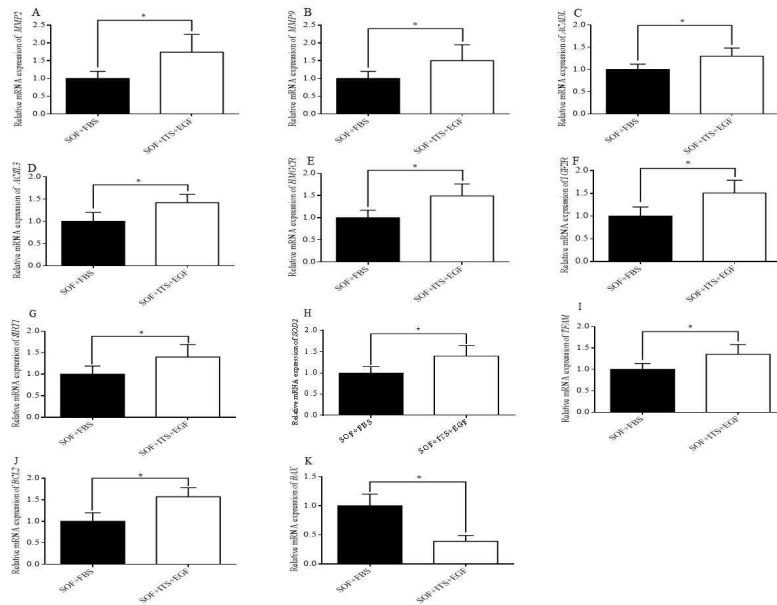


Fig 7. Relative mRNA levels of various genes in blastocysts determined by RT-qPCR. Relative mRNA levels of (A) MMP2, (B) MMP9, (C) ACADL, (D) ACSL3, (E) HMGCR, and (F) IGF2R in day 8 blastocysts. Relative mRNA levels of (G) SIRT1, (H) SOD2, (I) TFAM, (J) BCL2, and (K) BAX in frozen-thawed blastocysts. The asterisk indicates a significant difference ($P < 0.05$).

○수정란의 저온저장 기반기술 확보

수정란 저온저장의 기반기술을 확보하기 위하여 무혈청 배지에서 생산된 수정란의 저온보존 후 생존율과 부화율을 조사하였다. 무혈청 및 혈청배지 유래 수정란은 4°C에서 72시간 저장 후 생존율과 부화율을 각각 조사한 결과는 Table 3과 Fig. 8, 9과 같다. SOF+ITS_EGF 처리구 유래 수정란의 생존율과 부화율은 SOF+FBS 처리구보다 유의적으로 높았다 (100%, 76.3% vs. 68.5%, 40.5%) ($P < 0.05$). 저온저장수정란의 생존율은 동결수정란과 같이 수정란 내의 지질성분 총량이 생존율에 절대적인 영향을 미치는 것으로 판단된다. 무혈청배지 유래 수정란의 경우 지질성분이 절대적으로 줄어들어 저온저장의 생존율 개선에 큰 영향을 미치는 것으로 판단된다.

Table 3. Survival and hatching rates in vitro produce bovine embryos following storage at 4°C for 72 hrs

Groups	No. of blastocysts	No. (%) of survived embryos	No. (%) of hatched embryos
SOF+ITS+EGF	55	55 (100)*	42 (76.3)*
SOF+EGF	54	37 (68.5)	15 (40.5)

The symbol asterisks (*) shows the significant difference between two groups ($p < 0.05$).

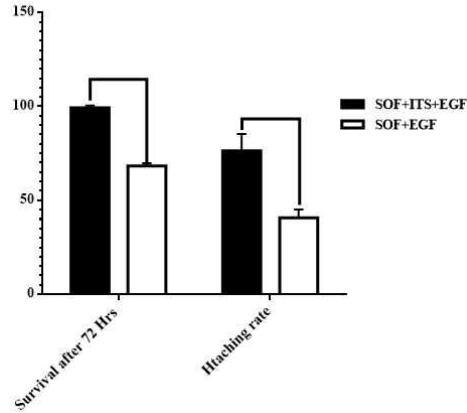


Fig. 8. Columns with asterisks (*) are significantly different ($p < 0.05$).

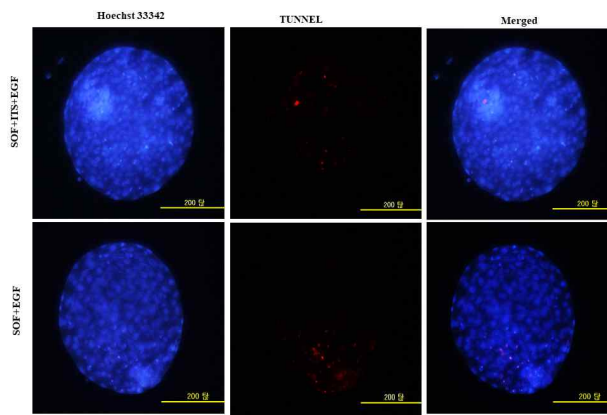


Fig. 9. Cell counting and TUNEL staining of in vitro produce bovine embryos store at 4°C for 72 hrs.

저온저장된 수정란의 질적수준을 평가하기 위하여 여러 분석을 통하여 평가를 실시하였으며 결과는 다음과 같다(Fig. 10, 11). 무혈청 및 혈청배지 유래 배반포의 mtDBANA 활성화의 조사에서 무혈청 처리구에서 유의적으로 높게 나타났다(Fig. 10). 또한 세포질 내의 지질성분의 차이를 비교해본 결과 무혈청처리구에서 유의적으로 낮게 나타나고 있다(Fig. 11). 이러한 결과는 무혈청배지 유래 수정란의 질적수준이 상대적으로 혈청배지 유래 수정란보다 높다는 것을 판단할 수 있다.

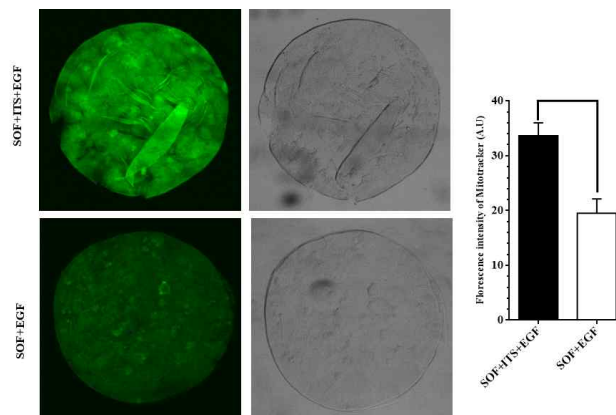


Fig. 10. Mitochondrial activity Shown by Mitotracker after 72 hrs storage at 4°C.

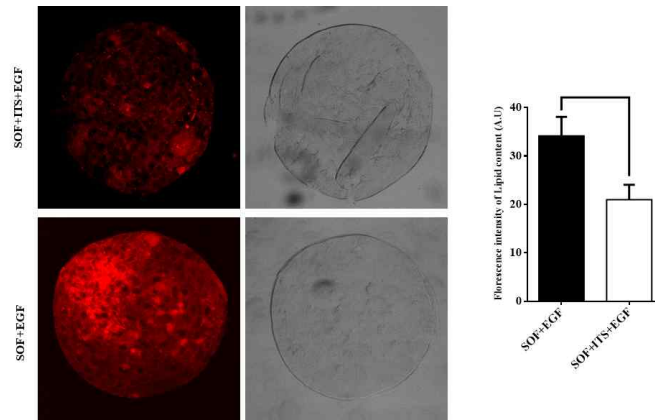


Fig. 11. Lipid content shown by Nile red after 72 hrs storage at 4°C.

○ 전사억제인자 조절에 의한 수정란저장 기반기술 확보

저온저장 기간을 늘이기 위해서 기존의 저온보존액에 전사억제인자를 첨가하여 4°C 냉장고에 1-9일까지 저장저온 후 24시간 배양 후 생존율 및 부화율을 비교분석한 결과는 Table 4에서 보는 바와 같다. 5일까지는 100% 생존율, 6일째 96.6%, 7일째 87.5%, 8일째 84.6% 및 9일째 78.6%로 생존율의 저하를 확인할 수 있었다. 또한 부화율은 3일째 50.0%, 4일째 41.7%, 5일째 22.2%, 6일째 28.6%로 급격한 하락을 보이고 있는 것을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과는 현재의 기술개발 수준에서 6일 정도까지 저온저장이 가능한 생존율을 보였으나, 부화율에서는 5일부터 22.2%까지 급격히 감소하는 경향을 보였다. 이와 같은 부화율의 개선을 위한 기술개발이 더 요구되고 있다. 즉 수정란이식 후 적정 수태율을 얻기 위해서는 생존율뿐만 아니라 부화율도 매우 중요한 요인으로 판단된다. 현재의 수준에서는 이식에 직접적인 활용보다는 부화율을 보장할 수 있는 수준까지의 기술개발이 더 요구되는 실정이다.

Table 4. Survival rate of low temperature storage blastocyst for 1 to 9 days.

Storage duration (days)	No. (%) of embryos		
	Recovered	Survived	Hatching
1	8	8 (100)	7 (87.5)
2	8	8 (100)	6 (75.0)
3	8	8 (100)	4 (50.0)
4	12	12 (100)	5 (41.7)
5	9	9 (100)	2 (22.2)
6	29	28 (96.6)	8 (28.6)
7	16	14 (87.5)	3 (21.4)
8	13	11 (84.6)	1 (9.1)
9	14	11 (78.6)	4 (36.4)

*Embryos were stored at 4°C temperature.

○ 세포외기질 침투능력 향상 기반기술 확보(생쥐)

수정란이식 시 수태율 향상을 위해 자궁외기질 침투능력을 강화시킬 수 있는 MMP-2 &

-9를 처리할 수 있는 기반기술을 확보하고자 한다. 이를 위해 먼저 실험동물인 생쥐에서 기초 데이터를 확보하여 소의 수정란이식으로 활용하고자 한다. 그리하여 생쥐의 자궁관류액 및 혈청 내에서 발정주기별 MMP-2 & -9의 농도를 조사한 결과는 Table 5, Fig. 12, 13에서와 같다. 발정주기에 따라 상당한 농도의 차이를 확인할 수 있었으며 적정 농도의 확인 및 결정은 매우 중요한 요인으로 판단된다.

Table 5. Updated data of MMP-2 & -9 ELISA kit.

	Sample	State	Concentration(ng/ml)
MMP-2	Uterus	Estrus	51
		2.5 dpc	258.91
	Fluid	3.5 dpc	59.42
		Estrus	835.955
	Plasma	2.5 dpc	849.377
		3.5 dpc	506.42
	Sample	State	Concentration(ng/ml)
MMP-9	Uterus	Estrus	0.466
		2.5 dpc	4.278
	Fluid	3.5 dpc	3.541
		Estrus	2.794
	Plasma	2.5 dpc	0.987
		3.5 dpc	8.25

MMP-2의 농도를 자궁관류액과 혈장에서 분석한 결과 발정주기별에 상당한 차이를 보이고 있는데 약 40 - 80 ng/ml의 농도를 확인할 수 있었다(Fig. 12, 13). MMP-9의 경우에는 자궁관류액에서 0.5 - 4 ng/ml 농도로서 큰 차이를 또한 보이고 있다. 이들의 적정농도를 찾기 위한 연구가 요구된다.

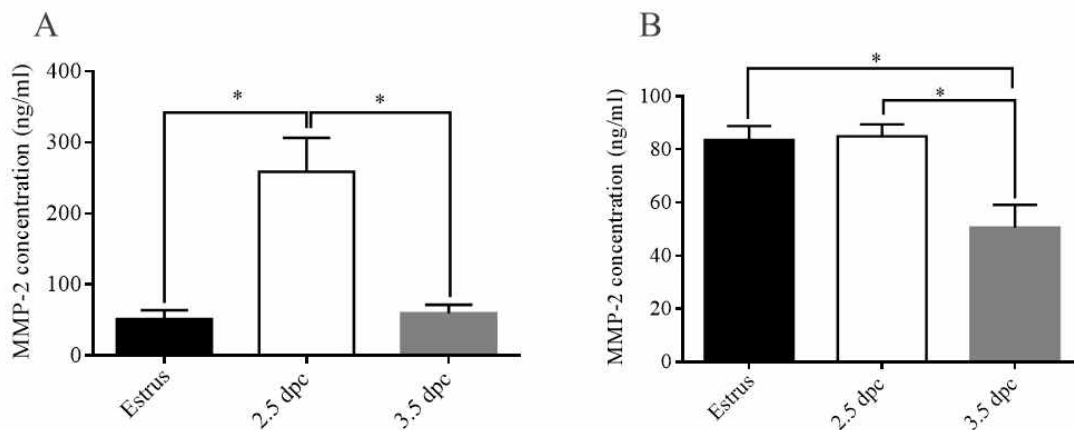


Fig. 12. Concentration of MMP-2 in Uterine fluid (A) and Plasma (B) at estrus phase, 2.5 and 3.5 dpc. The asterisk indicates a significant difference ($P < 0.05$).

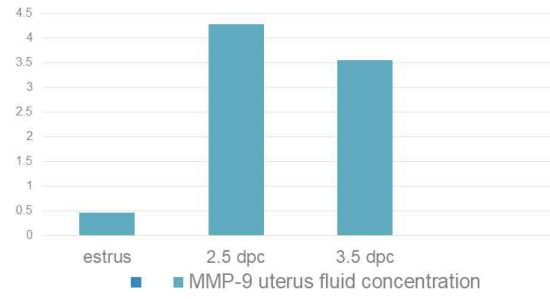


Fig. 13. Concentration of MMP-9 in Uterine fluid at estrus phase, 2.5 and 3.5 dpc.

2. <2세부(경상대학교) 난포과동주기 유래 OPU 수정란생산의 현장적용기술 확립>

○ 연구용 공란우 선발 및 질병검사 우 입식

연구용 공란우 자체보유 4두 외 경남 축산시험장에서 4두를 임대하여 질병검사 및 번식기관, 특히 난소의 발육상태가 우수한 개체를 선발/활용하였다. 선발된 공란우는 총 6두를 선발하여 채란을 실시하였다(그림 1).



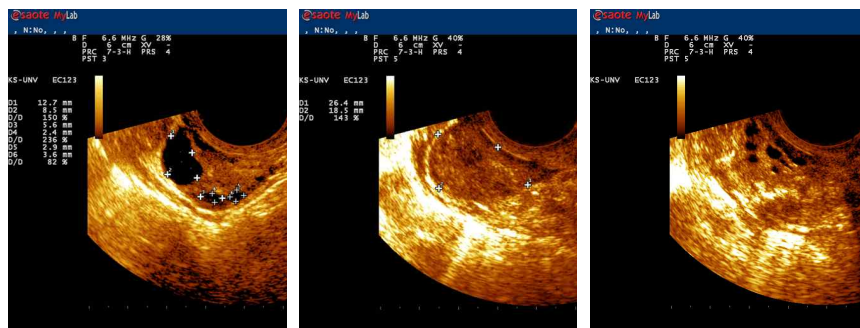
그림 1. 공란우 번식기관 및 난소 검사.

○ 난포과동주기별 난포의 분류기준 마련

난포주기별 난포를 분류하기 위하여 모든 공란우에서 난포를 제거 한 후로부터 주 1회 채란(그림2)을 실시하였다. 채란은 모든 난포를 채란하였으며, 채란 후 염색을 실시하여 각 공란우의 난자별 GV단계를 확인하였다. 결과는 표 1과 같다.

표 1. 공란우별 난포 생성 및 난자의 회수

공란우 번호	난포 수			난자 수	회수된 난자의 등급			
	왼쪽	오른쪽	총난포		Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4
3472	96	100	196	90	6	16	63	5
5101	79	104	183	93	8	8	74	3
2943	61	73	134	59	4	7	44	4
0692	67	50	117	55	6	7	41	1
7570	72	72	144	49	3	5	39	2



대난포 제거 전

대난포 제거 후

7~10일 난포

그림 2. 난포과동주기에서 난포의 발육상태 확인위한 초음파 상.

○ 난포과동주기별 GV 단계 난자의 비교분석

OPU를 통하여 채란된 난자는 염색을 실시하여 GV 단계별(그림3)를 확인하여 분석을 실시하였다. 공란우별 GV 단계별 수량은 표 2, 그림 3과 같다.

표 2. 공란우의 GV 단계별 난자 수량

공란우 번호	GV 단계 (%)				
	TOTAL	GV0	GV1	GV2	GV3
2943	61	4 (6.56)	14 (22.95)	30 (49.18)	13 (21.31)
5101	86	14 (16.28)	33 (38.37)	36 (41.86)	3 (3.49)
5732	33	0 (0.00)	6 (18.18)	18 (54.55)	9 (27.27)
7570	49	4 (8.16)	16 (32.65)	24 (48.98)	5 (10.20)
692	33	1 (3.03)	3 (9.09)	22 (66.67)	7 (21.21)
3472	66	8 (12.12)	18 (27.27)	36 (54.55)	4 (6.06)

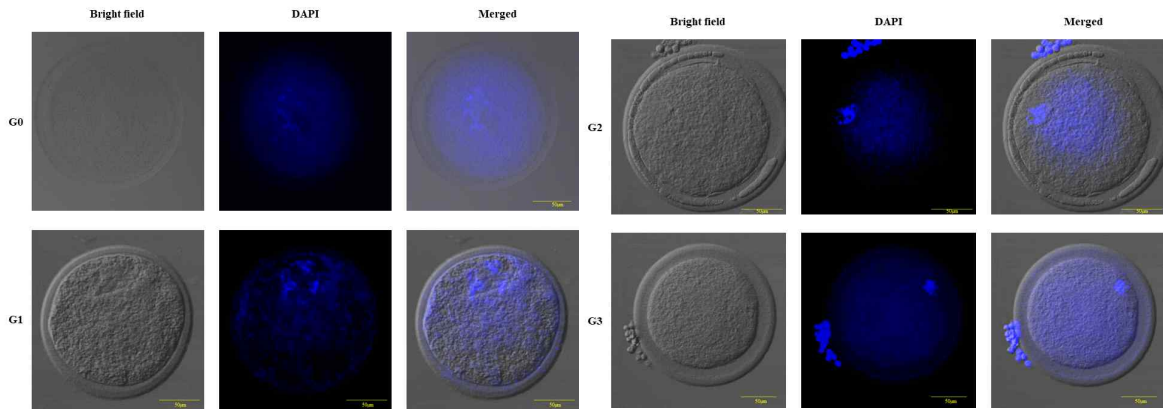


그림 3. 미성숙난자의 GV단계 난자의 핵성숙 단계별 형태.

이상의 결과를 확인해 본 결과 공란우별 채란이 가능한 GV2 단계의 수량의 차이를 확인하였으며 2주기 또는 3주기의 공란우를 선별하여 7~10일 간격으로 채란을 실시할 예정이다. 2차년 도부터는 이러한 성과를 통하여 채란 횟수를 줄이면서도 생산 가능한 수정란의 수량은 증대 할 수 있을 것으로 예상된다.

are participated)

2. 채혈, 베타카로틴 및 혈액성분 분석

□ 채혈

- 모든 공시축의 혈액(10 ml)을 채취하였으며, 혈액은 경정맥을 통하여 채취하였다.
- 채취된 혈액은 빛과 온도에 의한 베타카로틴 및 비타민 A의 파괴를 막기 위하여 즉시 알루미늄호일(aluminum foil)로 튜브를 감싼 후 얼음박스에 넣어 실험실로 운반하였다.
- 운반된 혈액샘플은 외부 빛이 완전 차단된 실험실에서 원심분리기를 이용하여 $3,000 \times g$ 에서 10분 동안 원심분리 후 상층액 2 ml를 튜브에 저장한 후, 즉시 -80°C 저온냉장고에 분석시까지 보관하였다.

□ 베타카로틴 분석

- 베타카로틴은 Ethanol을 이용하여 serum 속의 protein을 제거한 후 혈장내의 β -carotene을 hexane으로 추출하여 450nm에서 UV/VIS spectroscopy(Libra, Biochrom, UK)를 이용하여 흡광도를 읽어 분석하였다.

□ 혈액성분 분석

- 혈장 내 단백질, glucose, creatinine, 요소태질소(BUN), triglyceride, total cholesterol, HDL 및 LDL-cholesterol농도는 자동혈액분석기를 이용하여 분석하였다.

3. 통계분석

본 과제의 통계분석에 사용된 자료는 총 200두이었고, 데이터의 성질(numeric 또는 non-numeric)에 따라 분석방법을 달리하였다. 모든 자료는 SAS(SAS Institute, 2011)를 이용하여 분석하였고, non-numeric data(시군, 수태여부, 사양방식, 조사료급원)는 Freq Procedure를 이용하여 분석하였고, 또한 두 변수간의 연관성분석을 위해 option으로 Chisq를 이용하여 카이자승(X²)검정을 실시하였다. 또한 수태여부에 따른 가임암소의 월령 및 산차, 혈액값(즉, β -carotene, protein, glucose, creatinine, urea-N, triglyceride, total cholesterol, HDL 및 LDL-cholesterol)은 ttest Procedure를 이용하여 유의성검정을 하였고, 95% 신뢰구간(95% confidence level)에서 참고치를 제시하였다. 또한 사양방식에 따른 혈중 β -carotene 농도 분석을 위하여 급여방식(TMR 및 조농분리급여)과 조사료의 급원에 따른 분석도 실시하였다.

모든 자료의 유의성검정은 5%수준에서 실시하였다.

연구 수행 결과

- 표에서 나타난 바와 같이, 수태우수는 전체 분석두수(n=200)대비 87두로 43.5%로 나타났다.
- 평균산차는 두 그룹에서 각각 2.35 및 2.48산으로 수태우가 다소 높은 듯하나, 통계적인 차이는 나타나지 않았다. 또한 수정란 이식 월령은 각각 50.28 및 50.98개월령으로 수태에는 영향을 미치지 않았으나, 전반적으로 이식에 참여한 대리모의 나이가 3산미만으로 어려 수태연관성을 고려하기에는 미흡하였다.

Table 1. Statistical description between groups of cows subjected to survey

Item	Cows		Confidence Limit Mean		SED
	Non-pregnant	Pregnant	Non-pregnant	Pregnant	
Cows, n	113 (56.5%)	87 (43.5%)	-	-	
Parity	2.35±0.18	2.48±0.21	1.98 ~ 2.71	2.06 ~ 2.90	0.28
Age, month	50.28±2.33	50.98±2.72	45.68 ~ 54.89	45.57 ~ 56.38	3.57

- 조사에 참여한 농가지역이 수태에 미치는 영향은 나타나지 않았다. 거창과 고성을 제외한 참여시군 전역에서 비수태우가 월등히 높게 나타났다. 거창과 고성은 수태우와 비수태우임을 확인한 상태에서 동일 두수로 채혈하였다.

Table 2. The frequency and percentage of pregnant and non-pregnant cows by region

Region		Cows		Total	Chi-square	<P
		Non-pregnant	Pregnant			
Geochang	Frequency	5	5	10		
	%	2.50	2.50	5.00		
	Row %	50.00	50.00			
	Column %	4.42	5.75			
Goseong	Frequency	5	5	10		
	%	2.50	2.50	5.00		
	Row %	50.00	50.00			
	Column %	4.42	5.75			
Namhae	Frequency	21	16	37		
	%	10.50	8.0	18.50		
	Row %	56.76	43.24			
	Column %	18.58	18.39			
Sancheong	Frequency	7	4	11		
	%	3.50	2.00	5.50		
	Row %	63.64	36.36			
	Column %	6.19	4.60			
Hamyang	Frequency	35	26	61		
	%	17.50	13.00	30.50		
	Row %	57.38	42.62			
	Column %	30.97	29.89			
Hapcheon	Frequency	40	31	71		
	%	20.00	15.50	35.50		
	Row %	56.34	43.66			
	Column %	35.40	35.63			
Total	Frequency	113	87	200	0.5926	0.9883
	%	56.50	43.50	100.00		

- 수태우 군의 81.6%가 배합사료와 조사료를 분리급여하는 방식에서 사육되는 것으로 나타났고, TMR형태 사육된 소는 18.39%를 차지하였다.

- TMR급여농가(40두) 중에는 16두(40%) 번식우가 수태된 것으로 나타났고, 조농분리급여농가(160두)는 44.38%(71두)가 수태된 것으로 나타났다. 본 결과를 통해, TMR급여보다는 조농분리급여방식이 수정란 수태율에 다소 유리한 것으로 나타났다. 하지만, 전반적으로 급여방식

과 수태여부 간에 연관성은 나타나지 않았다.

Table 3. The frequency and percentage of pregnant and non-pregnant cows by feeding methods

Type		Cows		Total	Chi-squ are	<P
		Non-pregnant	Pregnant			
Separate feeding	Frequency	89	71	160		
	%	44.50	35.50	80.00		
	Row %	55.63	44.38			
	Column %	78.76	81.61			
TMR	Frequency	24	16	40		
	%	12.00	8.00	20.00		
	Row %	60.00	40.00			
	Column %	21.24	18.39			
Total	Frequency	113	87	200	0.2492	0.6176
	%	56.50	43.50	100.00		

- 조사료급원에 따른 결과를 보면, 수태우 및 비수태우군 공히 72%의 농가가 벃짚을 주로 활용하는 것으로 나타났고, 건초급여우는 전체 분석대상우 중 12.5%가 해당되었고, 그 외는 TMR에 배합된 조사료원에 의존하였다.

- 조사료급원과 수태율 간의 연관성은 기대할 수 없었고, 주로 급여된 조사료원을 베타카로틴 함량과 관련해서 기술하면, 본 조사에 참여한 농가의 조사료원은 주로 햇빛에 의해 베타카로틴이 산화 및 파괴되어 거의 존재하지 않는 것으로 보고되어 번식우의 수태율과의 연관성이 없었던 것으로 해석된다.

Table 4. The frequency and percentage of pregnant and non-pregnant cows by forage sources

Forages		Cows		Total	Chi-square	<P
		Non-pregnant	Pregnant			
Barley straw	Frequency	1	0	1		
	%	0.50	0.00	0.50		
	Row %	100.00	0.00			
	Column %	0.88	0.00			
Italian Rye grass	Frequency	2	2	4		
	%	1.00	1.00	2.00		
	Row %	50.00	50.00			
	Column %	1.77	1.77			
Kentucky Blue grass	Frequency	0	3	3		
	%	0.00	1.50	1.50		
	Row %	0.00	100.00			
	Column %	0.00	3.45			
Rye grass	Frequency	5	3	8		
	%	2.50	1.50	4.00		
	Row %	62.50	37.50			
	Column %	4.42	3.45			
Rice straw	Frequency	81	63	144		
	%	40.50	31.50	72.00		
	Row %	56.25	43.75			
	Column %	71.68	72.41			
TMR	Frequency	19	11	30		
	%	9.50	5.50	15.00		
	Row %	63.33	36.67			
	Column %	16.81	12.64			
Whole crop Barley	Frequency	5	5	10		
	%	2.50	2.50	5.00		
	Row %	50.00	50.00			
	Column %	4.42	4.42			
Total	Frequency	113	87	200	5.5979	0.4697
	%	56.50	43.50	100.00		

Table 5. Plasma metabolites and their criteria between pregnant and non-pregnant Hanwoo cows subjected to this survey

Item	Cows		Confidence Limit Mean		SED	<P
	Non-pregnant	Pregnant	Non-pregnant	Pregnant		
Cows, n	113 (56.5%)	87 (43.5%)	-	-		-
β -carotene, $\mu\text{g/dL}$	45.21 \pm 3.19	46.20 \pm 3.42	38.90 ~ 51.52	39.39 ~ 53.02	4.71	0.8336
Protein, g/dL	7.39 \pm 0.05	7.42 \pm 0.06	7.29 ~ 7.50	7.30 ~ 7.54	0.08	0.6852
Glucose, mg/dL	70.00 \pm 0.79	67.36 \pm 0.74	68.44 ~ 71.56	65.89 ~ 68.83	1.11	0.0180
Creatinine, mg/dL	1.46 \pm 0.03	1.51 \pm 0.03	1.41 ~ 1.51	1.44 ~ 1.57	0.04	0.2858
Urea-N, mg/dL	12.41 \pm 0.37	12.42 \pm 0.45	11.67 ~ 13.14	11.52 ~ 13.31	0.58	0.9868
Triglyceride, mg/dL	27.43 \pm 0.77	27.30 \pm 0.94	25.91 ~ 28.96	25.42 ~ 29.18	1.21	0.9104
Total Cholesterol, mg/dL	132.76 \pm 3.79	120.99 \pm 3.74	125.24 ~ 140.28	113.54 ~ 128.43	5.43	0.0314
HDL-cholesterol, mg/dL	123.74 \pm 3.60	113.05 \pm 3.54	116.62 ~ 130.87	106.00 ~ 120.09	5.17	0.0399
LDL-cholesterol, mg/dL	24.71 \pm 1.13	21.61 \pm 1.29	22.47 ~ 26.95	19.04 ~ 24.17	1.72	0.0728

- 혈중 β -carotene 농도는 미수태우군 및 수태우군에서 각각 45.21 및 46.20 $\mu\text{g/dL}$ 로 두 군간에 유의한 차이는 나타나지 않았다. 하지만, 선진국의 연구자가 제안한 수준(젓소기준 : 350 $\mu\text{g/dL}$, 한우 번식우 자료부재)을 감안하면, 국내 가임암소의 β -carotene 농도는 대략적으로 8분의 1수준으로 턱없이 부족한 것으로 확인되었다.

- 혈중 glucose 농도는 두 그룹 간에 현저한 차이를 나타내어, 수태우군이 미수태우군보다 유의하게 낮았다. 95% 신뢰구간에서 수태우를 향상시키기 위한 대리모의 조건은 65.9 ~ 68.8 mg/dL가 적정한 것으로 나타났다.

- 또한 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 또한 수태우군에서 유의하게 낮은 값을 나타내었다. 수태우의 참고치는 각각 114~128, 106~120 mg/dL의 값을 나타내었다.

Table 6. Plasma metabolites concentrations by feeding methods for Hanwoo cows subjected to this survey

Item	Feeding methods		SED	<P
	Separate feeding	Mixed feeding		
Cows, n	160 (80%)	40 (20%)		-
β -carotene, $\mu\text{g/dL}$	46.08 \pm 2.61	43.89 \pm 5.22	5.84	0.7075
Protein, g/dL	7.42 \pm 0.04	7.33 \pm 0.10	0.10	0.3098
Glucose, mg/dL	68.39 \pm 0.65	70.7 \pm 0.94	1.38	0.0470
Creatinine, mg/dL	1.52 \pm 0.02	1.35 \pm 0.05	0.05	0.0019
Urea-N, mg/dL	12.61 \pm 0.32	11.65 \pm 0.65	0.71	0.1794
Triglyceride, mg/dL	27.20 \pm 0.66	28.05 \pm 1.42	1.48	0.5688
Total Cholesterol, mg/dL	126.64 \pm 3.03	131.65 \pm 6.16	6.80	0.4621
HDL-cholesterol, mg/dL	118.67 \pm 2.86	121.20 \pm 5.99	6.42	0.6939
LDL-cholesterol, mg/dL	23.68 \pm 0.97	22.23 \pm 1.78	2.13	0.4946

- 조농분리급여와 혼합급여 방식 간에 베타카로틴, 단백질, 요소태질소, 중성지방, 총콜레스테롤 및 HDL- 및 LDL-콜레스테롤농도는 유의한 차이가 나타나지 않았다. 국내 사양환경 및 조사료 급원은 사양방식이 방식이 달라도 원료면과 조사료 생산 및 제조방식이 비슷하여 뚜렷한 차이가 없었던 것으로 평가된다.

- 하지만, glucose농도는 혼합급여방식에서 유의하게 높았고, 크레아티닌농도는 조농분리급여 방식에서 유의하게 높게 나타났다. 이는 TMR내 탄수화물의 발효로 영양성 이용성이 좋아 glucose 농도가 높아진 것으로 생각되고, creatinine은 배합사료내 단백질 급원과 관련되는 것으로 보인다.

○ 사양시험 : 농가관행 이용되는 시판 베타카로틴의 효용성 조사

현재 수정란이식 농가를 중심으로 수태율 향상을 위한 노력으로 시판되고 있는 베타카로틴제를 급여하고 있으나, 이에 대한 효능에 대한 검토가 이루어져 있지 않다. 이에 본 과제에서 소화 흡수를 통하여 혈중에 얼마나 나타나는지를 조사하여 본 코팅처리 베타카로틴의 개발의 필요성을 뒷받침하고자 한다.

Table 7. Chemical composition in TMR as a basal diet and commercial β-carotene products

Items	Diet sources	
	TMR (basal diet)	β-carotene products*
	----- % of dry matter -----	
Dry matter, %	56.24	92.36
Organic matter, %	86.85	69.65
Crude protein, %	11.45	13.93
ADF1), %	21.19	9.28
NDF2), %	38.49	20.69
Ether extract, %	5.95	2.24
Crude fiber, %	19.52	8.56
Non-fibrous carbohydrate, %	30.86	32.78
Crude ash, %	13.15	30.35
Calcium, %	1.75	7.19
Phosphorus, %	0.45	0.76
TDN3), %	68.02	63.48
DE4), Mcal/kg of DM	3.00	2.80
ME5), Mcal/kg of DM	2.46	2.30

* 4,000 mg of β-carotene per kilogram was included as described in the products.

¹⁾acid detergent fiber; ²⁾neutral detergent fiber; ³⁾total digestible nutrients; ⁴⁾digestible energy; ⁵⁾metabolisable energy

1. 공시축 배치 및 사양관리

- 공시축으로 가임암소 9두(개시체중;510±21.85kg)를 선정 한 후, 처리구간 개시체중의 차이가 크지 않도록 총 3개의 우방(4×8m)에 각 3두씩 배치하였고, 물은 자유롭게 섭취할 수 있게 하였다.

- 처리구는 대조구(무첨가구), 시판 베타카로틴제제 권장수준구(100 g/일), 시판 베타카로틴제제 과잉급여구(300 g/일)로 총 3개의 처리구로 구분하였으며, 처리구당 3두씩 공시하여 3 replicated Latin square design으로 사양시험을 실시하였다. 각 period는 4주로 이루어졌고, 총 3 period 12주간 사양시험을 실시하였다.

- 사양시험이 진행되는 동안, 사료는 1일 2회 아침, 저녁으로 나누어 급여하였고, 매일 급여량

과 잔량을 기록하여 사료섭취량을 조사하였다. 그리고 영양소섭취량을 조사하기 위하여 매주 1회 급여사료를 채취하여 수분과 영양소함량을 분석하였다.

- 시험사료는 산청군소재 섬유질 배합사료공장에서 생산되는 TMR을 사용하였으며, 시판 베타카로틴제제는 J사에서 생산되는 것을 사용하였다. 이들의 일반성분은 표?에 나타내었고, 실험처리구별 섭취량에 따른 영양소구성비는 표8에 나타내었다.

- 시판 베타카로틴 첨가군(100g 및 300g 급여군)은 아침, 저녁 사료급여 시 TMR에 탑드레싱 방법으로 급여하여 전량 섭취하도록 하였다.

- 실험이 진행되는 동안, 각 period의 27일 및 28일째 채혈을 6회에 걸쳐 실시하였고, 채취된 혈액은 아이스박스에 넣어 실험실로 운반하였고, 빛을 차단한 환경에서 혈장을 분리하였다.

Table 8. Chemical composition in experimental diets

Items	Treatments		
	Control	β -carotene product 100 g/cow/day*	β -carotene product 300 g/cow/day**
	% of dry matter		
Dry matter, %	59.46	57.32	58.03
Organic matter, %	86.84	86.55	84.54
Crude protein, %	11.49	11.53	11.60
ADF1), %	21.22	21.00	20.60
NDF2), %	38.64	38.31	37.72
Ether extract, %	5.97	5.91	5.80
Crude fiber, %	19.67	19.48	19.13
Non-fibrous carbohydrate, %	30.74	30.80	30.89
Crude ash, %	13.16	13.45	15.46
Calcium, %	1.76	1.85	2.02
Phosphorus, %	0.44	0.45	0.46
TDN3), %	67.94	67.87	67.74
DE4), Mcal/kg of DM	3.00	3.00	3.00
ME5), Mcal/kg of DM	2.45	2.45	2.45

* recommended level, which is equivalent to 400 mg of β -carotene.

** 3 times dosage over recommended level, which is equivalent to 1,200 mg of β -carotene.

¹⁾acid detergent fiber; ²⁾neutral detergent fiber; ³⁾total digestible nutrients; ⁴⁾digestible energy; ⁵⁾metabolisable energy

2. 채혈, 비타민 A, 베타카로틴 및 혈액성분 분석

□ 채혈

- 모든 공시축의 혈액(10ml)을 채취하였으며, 혈액은 경정맥을 통하여 채취하였다.
- 채취된 혈액은 빛과 온도에 의한 베타카로틴 및 비타민 A의 파괴를 막기 위하여 즉시 알루미늄호일(aluminum foil)로 튜브를 감싼 후 얼음박스에 넣어 실험실로 운반하였다.
- 운반된 혈액샘플은 외부 빛이 완전 차단된 실험실에서 원심분리기를 이용하여 3,000에서 10분 동안 원심분리 후 상층액 2ml를 튜브에 저장한 후, 즉시 -80℃ 저온냉장고에 분석시까지 보관하였다.

□ 비타민 A 분석

- 비타민 A는 혈중 retinol을 분석하였으며, HPLC(Perkinelmer, Series 200, USA)를 이용하여 분석하였으며, 분석방법을 요약하면 다음과 같다.

- 혈청 200 μ l, internal standard 20 μ l 및 kit 용액 I 25 μ l을 갈색병에서 혼합시킨 후 400 μ l의 kit 용액 II를 혼합하여 9,000 \times g에서 10분간 원심분리 후 상층액 50 μ l를 HPLC에 주입하여 분석하였다.

□ 베타카로틴 분석

- 베타카로틴은 Ethanol을 이용하여 serum 속의 protein을 제거한 후 혈장내의 β -carotene을 hexane으로 추출하여 450nm에서 UV/VIS spectroscopy(Libra, Biochrom, UK)를 이용하여 흡광도를 읽어 분석하였다.

□ 혈액성분 분석

- 혈장 내 단백질, glucose, creatinine, 요소태질소(BUN), triglyceride, total cholesterol, HDL 및 LDL-cholesterol농도는 자동혈액분석기를 이용하여 분석하였다.

3. 통계분석

- 모든 자료는 SAS(SAS Institute, 2011)의 MIXED procedure를 이용하여 분석하였다. 모델식은 다음과 같다.

$$Y_{ijk} = \mu + a_i + \beta_j + \tau_k + e_{ijk}$$

Y_{ijk} 는 종속변수, μ 는 전체평균값, a_i 는 임의효과로서 i 번째 동물효과, β_j 는 j 번째 period효과, τ_k 는 k 번째 처리구효과, e_{ijk} 는 잔차

- 상기모델은 영양소섭취량에 해당된다. 반면, 반복적으로 혈액을 채취하여 분석한 항목(비타민 A, β -carotene 및 혈액대사물질)에 대하여는 다음의 모델 repeated measures를 적용하였다. 아울러 공분산구조(covariance structure)는 AR(1)을 적용하여 분석하였다.

$$Y_{ijkl} = \mu + a_i + \beta_j + \gamma_k + \tau_l + (\gamma\tau)_{kl} + e_{ijkl}$$

Y_{ijkl} 는 종속변수, μ 는 전체평균값, a_i 는 임의효과로서 i 번째 동물효과, β_j 는 j 번째 period효과, γ_k 는 k 번째 처리구효과, τ_l 는 l 번째 시간효과, e_{ijkl} 는 잔차

- 평균값은 LSMEANS procedure를 이용하여 산출하였다. 유의성은 P값 0.05이하일 때 유의성이 인정되고, 경향은 0.10이하로 인정하였다.

연구 수행 결과

1. 영양소섭취량

- 표에서 보는 바와 같이 건물섭취량은 β -carotene급여량이 증가함에 따라 유의한 증가를 나타내었으나, 유기물섭취량에는 차이가 나타나지 않았다.

- 조단백질, 조회분 및 비섬유성탄수화물 섭취량은 β -carotene제제의 급여량이 증가함에 따라 유의한 증가를 나타내었고, 이는 β -carotene제제의 조성물의 특징이 반영된 결과로 사료된다. 하지만, TDN 및 가소화에너지, 대사에너지 섭취량은 처리군 간에 차이가 나타나지 않았다.

Table 9. Body weight and nutrient intakes in Hanwoo cows fed experimental diets

Items	Treatments			SEM	<P
	Control	β -carotene product 100 g/cow/day	β -carotene product 300 g/cow/day		
	Nutrient intake				
Dry matter, kg	5.69b	5.71ab	5.82a	0.052	0.0410
Organic matter, kg	4.94	4.94	4.92	0.046	0.9199
Crude protein, kg	0.65b	0.66ab	0.68a	0.007	0.0076
ADF, kg	1.21	1.20	1.20	0.013	0.7865
NDF, kg	2.20	2.19	2.20	0.022	0.8240
Ether extract, kg	0.34	0.34	0.34	0.003	0.4219
Crude fiber, kg	1.12	1.11	1.11	0.012	0.6094
Crude ash, kg	0.75b	0.77b	0.90a	0.008	<0.0001
Nitrogen free extract, kg	2.83	2.83	2.88	0.025	0.0553
Non-fibrous carbohydrate, kg	1.75b	1.76b	1.80a	0.016	0.0154
TDN, kg	3.87	3.88	3.94	0.034	0.0753
DE, Mcal/day	17.04	17.08	17.39	0.152	0.0581
ME, Mcal/day	13.97	14.01	14.26	0.123	0.0546

2. 혈중 β -carotene 및 비타민 A 농도

- 표에서 보는 바와 같이 β -carotene 농도는 시판 β -carotene 제제를 급여하여도 체내 흡수 및 이용율이 거의 없는 것으로 나타났다.
- 보통은 β -carotene이 장점막세포로 흡수되면, β -carotene-15,15'-monooxygenase의 작용으로 2개의 retinal을 형성하며, 이렇게 형성된 retinal은 retinal reductase의 작용으로 retinol로 환원되어 혈중에서는 retinol로서 일종의 비타민 A로 전환된다.
- 하지만, retinol의 농도 또한 처리구 간에 유의한 차이가 없어, 시중에 시판되고 있는 β -carotene 제제는 장점막까지 대부분 도달하지 못하는 것으로 나타났다. 이는 장점막 도달 이전에 반추위 내에서부터 대부분의 β -carotene이 파괴되는 것으로 판단된다.

Table 10. Plasma β -carotene and retinol concentrations of cows fed diets supplemented with β -carotene products

Items	Treatments			SEM	<P
	Control	β -carotene product 100 g/cow/day	β -carotene product 300 g/cow/day		
β -carotene, $\mu\text{g/dL}$	47.50	37.58	43.25	11.520	0.1926
Retinol, $\mu\text{g/dL}$	26.94	26.78	24.33	1.270	0.2786

3. 혈중 대사물질

- 혈중 대사물질은 단백질, creatinine, 중성지방의 수치가 β -carotene 제제의 급여로 유의하게 낮아진 반면, glucose는 대조구에 비하여 급여수준별로 유의하게 높아졌다.

- 혈중 요소태질소, 총 콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤 수치는 처리구간에 차이가 나타나지 않았다. 하지만, LDL-콜레스테롤 수치는 권장수준의 3배인 β -carotene제제 300g 급여군에서 가장 낮은 결과를 나타내었다. 이 모든 결과는 β -carotene의 성분에 기인한 것보다는 제제에 포함된 다른 성분들의 영향인 것으로 사료된다.

Table 11. Plasma metabolites concentrations of cows fed diets supplemented with β -carotene products

Items	Treatments			SEM	<P
	Control	β -carotene product 100 g/cow/day	β -carotene product 300 g/cow/day		
Protein, g/dL	7.64	7.38	7.48	0.052	0.0039
Glucose, mg/dL	68.78	73.39	77.56	1.046	<0.0001
Creatinine, mg/dL	1.71	1.51	1.23	0.062	<0.0001
Urea nitrogen, mg/dL	12.28	11.28	11.33	0.493	0.2848
Triglyceride, mg/dL	40.61	23.61	24.89	2.288	<0.0001
Total cholesterol, mg/dL	156.83	171.11	151.61	7.486	0.1769
HDL cholesterol, mg/dL	153.44	153.00	149.44	7.432	0.9169
LDL cholesterol, mg/dL	24.78	34.67	22.06	1.716	<0.0001

○ 보호 베타카로틴의 개발과 이의 반추위 in vitro 안정성 조사

- 이전 시험에서 조사한 바와 같이 기존 시판되는 β -carotene제제는 장점막에 도달하기 이전에, 즉 반추위내에서 대부분 분해되어 소멸되는 것으로 나타나 혈액을 통한 β -carotene의 이행이 나타나지 않았음.
- 현재까지 한우 번식우에 대한 β -carotene 요구량이 구체적으로 밝혀져 있지 않으나, 수태율 향상에 긍정적인 영향을 미치는 바 이에 대한 효율적인 공급방법의 모색이 필요함.
- 젖소에서 하루에 두당 300 mg을 추가로 급여할 것을 권장하고 있거나, 혈중 최소 mL당 3 μ g이상의 농도로 유지시킬 것을 권장하고 있음(Herd and Stowe, 1991).
- 반추위내에서 대부분의 β -carotene이 분해되기 때문에 반추위를 통과하여 소장에서 흡수되어 이용될 수 있도록 반추위 보호기술 개발이 필요하다.
- 기본적으로 β -carotene은 지용성물질로서 식물체의 카로티노이드계 색소의 일종으로 비타민 A의 전구체의 역할을 함. 따라서, 이러한 성질을 이용하여 기존의 보호기술을 응용하여 반추위내 안정적이면서, 소장으로 이행하여 흡수효율을 높이기 위한 보호 코팅 β -carotene제제를 개발하는데 주력하였고, 이의 반추위내 안정성을 검증하기 위하여 in vitro 반추위내 β -carotene 소실을 실험을 실시하였음.

연구 수행 방법

1. 보호 β -carotene제제의 개발

- 개발 보호 β -carotene제제는 반추위내에서 미생물, pH 및 수분에 의해 분해되지 않고, 안정하게 하부 소화기관으로 이동해서 흡수될 수 있도록 2단계 코팅과정을 거쳐 이중 코팅처리하

여 보호 β -carotene을 제조한 것으로 구체적인 제조공정은 공개하지 않는다.

2. 실험방법

- 반추위액의 채취는 김해시 소재 축산물공판장에서 도축된 한우 반추위 내용물을 보온병에 수거하여 실험실로 운반하였고, 4겹의 cheese cloth로 여과한 후 미리 예열된 39°C 보온병에 담고, O₂ free-CO₂ gas를 30초간 주입하여 보온병내의 공기를 제거한 후 반추위액 혼합 buffer제조에 사용하였다.
- in vitro 배양액은 반추위액 400mL를 미리 제조한 buffer solution 1,600mL와 혼합하여 제조하였다. Buffer solution에 반추위액 첨가즉시, O₂ free-CO₂ gas를 30초간 주입하여 배양 jar내의 공기를 배제하여 혐기상태를 유지하였으며, 그 후 39°C에서 30분간 안정시킨 후 본 시험에 이용하였다.

3. 시험구 배치

- In vitro 분해시험은 2대의 DAISY II incubator (Ankom, USA)를 이용하여 실시하였는데, 시험기간 동안 incubator의 온도는 항상 39.5±0.5°C로 유지하였다.
- 시험구 처리는 처리구당 6반복으로 2처리구(비보호 β -carotene 급여구 및 보호 β -carotene 급여구)로 나누어 1mm의 입자크기로 분쇄 및 건조한 배합사료와 티모시 건초를 각각 4g과 dextrose와 xylose를 각각 1g을 비보호 및 보호 β -carotene 급여구에 공히 첨가한 후, 대조구와 처리구에 각각 비보호 β -carotene제제(국내 시판제품, 0.2% BC)와 보호 β -carotene제제(개발제품, 0.2% BC) 0.1g(200 μ g BC)을 각각 나일론백에 넣어 봉입한 후, 첨가하여 배양하였다.

3. 조사항목 및 분석 전 처리

- in vitro 배양 0, 3, 6, 9, 12시간 별로 각각 배양액을 즉시 pH meter(Corning 445, USA)로 pH를 측정하고, 배양시간별로 각 처리구의 배양이 끝난 나일론백을 회수하여 흐르는 수돗물에 세척 후 물기를 제거한 후 -80°C냉동고에 보관 및 동결건조 후 무게를 측정하였고, 이후 β -carotene함량을 분석하여 그 소실률을 구하였다.

4. 통계분석

본 실험에서 얻어진 결과들은 SAS package (2011)을 이용하여 분석분석 및 Tukey법으로 처리구간의 유의성을 검정하였다.

연구 수행 결과

Table 12. Effects of unprotected or encapsulated β -carotene (BC) supplement on in vitro ruminal pH

Times (hr)	Treatments		SEM	< P
	Control	encapsulated BC		
0	6.81	6.81	-	-
3	6.31	6.43	0.02	0.0415
6	6.25	6.31	0.02	0.0727
9	6.19	6.29	0.02	0.0616
12	6.04	6.13	0.02	0.0423

- 표에서 나타난 바와 같이 pH는 배양시간이 지속됨에 따라 비보호 β -carotene 급여구인 대조구가 처리구보다 3시간과 12시간에서 유의하게 낮았다 ($P < 0.05$).
- 하지만, 보호처리 β -carotene 급여구는 대조구보다 완만한 pH하강을 나타내어 분해가 덜 일어나는 것으로 판단되며, 이는 β -carotene이 반추위내에서 대조구에 비해 분해가 덜 일어나는 것을 간접적으로 시사하였다.

Table 13. Effects of the protected β -carotene (BC) supplement on in vitro β -carotene disappearances (%)

Times (hr)	Treatments		SEM	< P
	Unprotected BC	Protected BC		
0	13.23	3.78	3.25	<0.0001
3	32.34	9.98	5.67	<0.0001
6	52.91	17.29	8.21	<0.0001
9	67.25	25.54	9.29	<0.0001
12	73.62	29.15	9.74	<0.0001

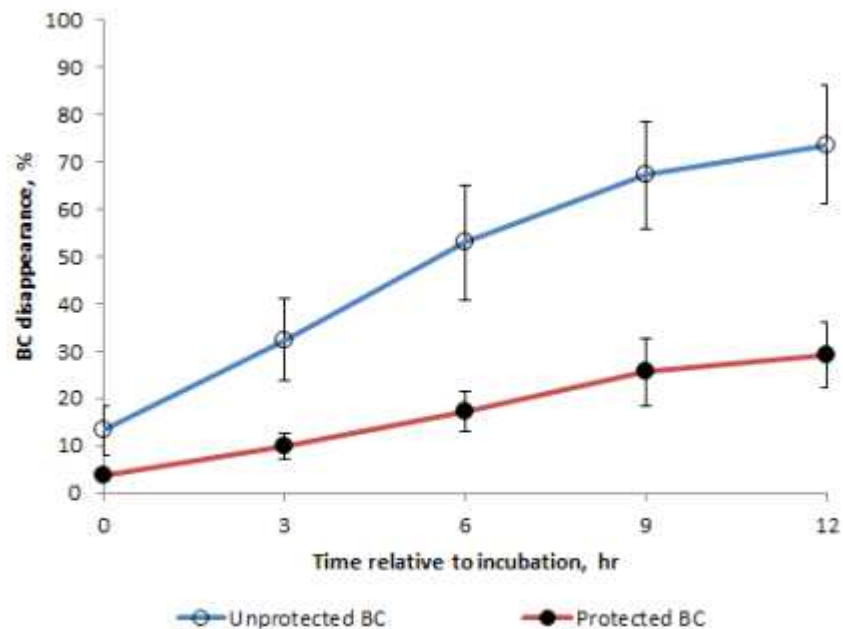


Figure 2. BC disappearances of protected BC products in in vitro rumen incubation system

- in vitro β -carotene(BC) 소실률은 비보호 베타카로틴제제(unprotected BC)가 급격하게 분해되는 양상을 보여주었고, 배양 12시간후에 73.62%의 소실률을 보여준 반면, 본 연구진에 의해 개발된 보호 베타카로틴제제(protected BC)는 29.15%로 약 70%가 반추위내에서 보호되는 것으로 나타났다.
- 식물체내에 존재하는 BC를 반추동물이 섭취하면, 반추위내 분해정도는 20~30%정도로 보고되나(King et al., 1962; Keating et al., 1964), 사료 보충제제는 대개 약 50% 이상의 높은 수준으로 분해되는 것으로 보고된다(Nozière, 2006).

2절. 2차년도 세부연구수행 결과

1. <1세부(경상대학교) : OPU유래 수정란의 질적 수준 분석 및 이식 적용기술 확립>

○ 무혈청배지 유래 수정란의 질적수준 분석 및 이식 적용

1차년도에 SOF 배지에 ITS를 첨가한 무혈청배지를 개발하여 수정란을 생산기반을 확립하였고, 2차년도에 완벽한 무혈청배지, 즉 체외성숙 단계에서도 혈청을 완전히 제거하는 배양시스템을 구축하기 위해 3 처리구 (10% FCS + IVM, BSA + IVM 및 serum free IVM)로 체외성숙을 및 체외수정란을 생산하여 그 효율을 비교하였다.

무혈청배지에서의 체외성숙은 혈청 첨가한 체외성숙율의 비교에서 유사한 결과를 보였으나, 과립막세포의 팽창율은 혈청 첨가군보다 유의적으로 낮았다 (Fig. 1). 즉 난자 내에 존재하는 핵의 발달율은 큰 차이가 없이 유사한 결과를 얻었으나, 과립막세포의 팽창율은 유의적으로 낮은 것을 확인할 수 있었다. 이러한 측면에서 세포질의 완전한 성숙에 약간의 한계가 있는 것이 아닌지에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

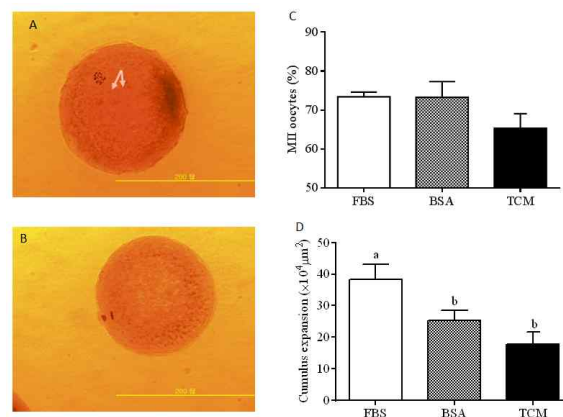


Fig 1. Stages of nuclear maturation determined by aceto-orcein staining of oocytes after 24 h of IVM. (A) Metaphase of the first meiotic division (MI). (B) Metaphase of the second meiotic division (MII). Scale bar, 200 μm . (C) Percentage of oocytes at MII cultured in the FBS, BSA or TCM for 24 h. (D) Cumulus cell expansion after 24 h of IVM. Columns with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

Serum free 처리구의 분활율, 배반포 발달율 및 부화율 등은 Serum group과 유사한 결과를 얻었다 (Table 1). 이와 같은 결과에서 수정란의 생산효율, 즉 배반포 생산율, 부화율 등에 차이가 없다면 완전한 무혈청배지를 이용한 OPU 유래 수정란의 생산도 충분히 가능할 것으로 판단된다. 이러한 무혈청유래 수정란이식에 의한 송아지 생산에서 혈청에 의한 다양한 문제점을 극복함으로써 수정란이식에 의한 우량한우로의 개량에 큰 기여를 할 것으로 판단된다.

Table 1. Cleavage, development, and hatching rates of embryos in different media.

Groups	Oocytes*	Presumed zygotes	Cleaved embryos (% ± SEM)	Blastocysts (% ± SEM)**	Hatched blastocysts (% ± SEM)
FBS	390	375	301 (80.4 ± 1.5)	140 (37.4 ± 1.5)	58 (41.1 ± 2.2)a
BSA	340	331	256 (77.5 ± 2.2)	103 (31.1 ± 3.9)	34 (33.5 ± 1.9)b
TCM	403	396	318 (80.2 ± 1.0)	137 (34.5 ± 1.8)	52 (38.4 ± 2.5)ab

^{a-d} Values with different superscripts in the same column are significantly different (P < 0.05).

* Six replicates were performed.

** Rates are relative to the number of presumed zygotes.

혈청 첨가 및 무첨가의 3그룹별로 생산된 배반포의 질적 수준을 조사하기 위해서 총 세포수와 사멸세포수를 비교분석한 결과는 Fig. 2에서와 같다. 배반포의 총세포수는 룬 그룹과 BSA 그룹간에는 유의적인 차이가 없었으나, 무혈청그룹은 유의적으로 낮은 결과를 보였다. 또한 사멸세포수는 BSA 및 무혈청 그룹이 혈청 첨가그룹보다 유의적으로 높았다. 이와 같은 결과에서 완전한 무혈청그룹은 총 세포수와 사멸세포수의 증가에 의한 질적 수준이 저하되는 것을 볼 수 있다. 즉 그렇다면 혈청을 대체할 BSA의 첨가그룹은 총세포에서는 혈청그룹과 차이가 없었고, 사멸세포수는 유의적으로 높은 결과를 얻었다. 현재의 결과를 분석하면 수정란의 생산 효율에는 문제가 없으나, 수정란의 질적수준에는 한계가 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 한계점을 극복하기 위한 배양기술을 3차년도에 개발하여 개선된 배양체계를 구축하는 것이 필요할 것으로 판단된다.

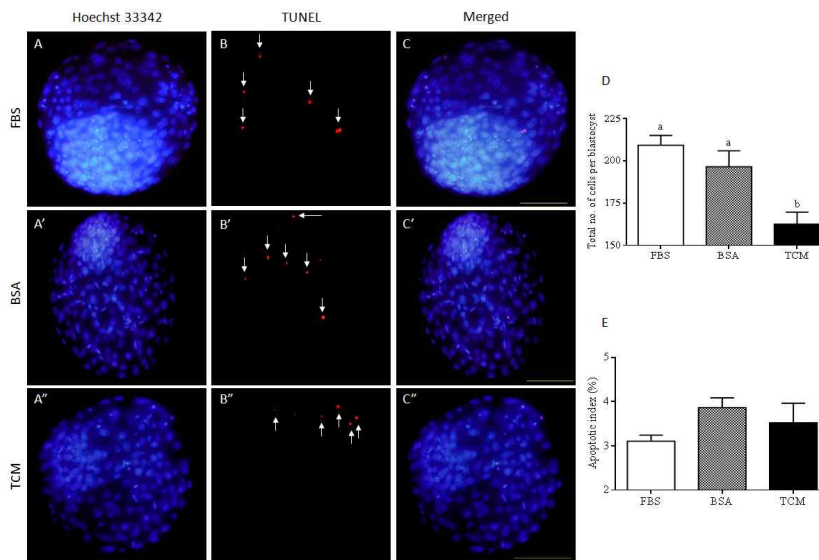


Fig 2. Day 8 bovine embryos were stained with Hoechst 33342 to determine the total cell number, and TUNEL was performed to identify apoptotic index. Embryos were cultured in the (A-C) FBS, (A' -C') BSA, and (A''-C'') TCM groups. Scale bar, 200 μ m. (D) Mean total cell numbers determined by Hoechst 33342 staining. (E) Mean total apoptotic cell numbers determined by TUNEL.

또 다른 수정란의 질적수준을 분석하기 위해서 mitochondria 활성화를 분석한 결과 BSA 및

무혈청 그룹에서의 수정란이 혈청 첨가그룹보다 mitochondria 활성화가 유의적으로 높게 나타났다. 세포질에 존재하고 있는 mitochondria의 활성화는 혈청 첨가그룹에서 유의적으로 낮은 결과를 보이는 것은 수정란의 질적수준이 낮다는 것을 의미할 수 있을 것이다. 그러나 지금까지의 결과, 즉 총 세포수, 사멸세포수 등의 결과와는 상반되는 결과로서 추가적인 분석이 요구되며, 3차년도에는 이러한 차이점이 무엇을 의미하고 질적수준이 높은 수정란의 생산을 어떻게 할 수 있을 것인지에 대한 심도있는 연구가 필요하고, 또한 이러한 시스템에서 생산된 수정란을 이식하여 수태율 개선이 영향을 미칠 수 있는 기술을 개발하고자 한다.

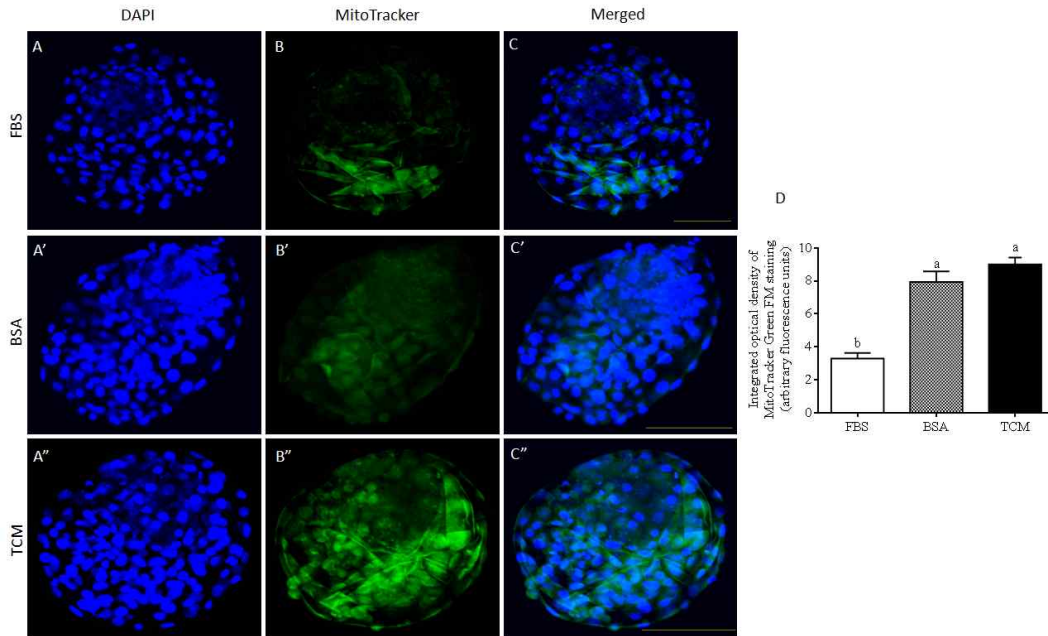


Fig 3. Fluorescence intensity of mitochondrial staining in day 8 blastocysts. MitoTracker Green staining of day 8 blastocysts in the (A-C) FBS, (A'-C') BSA, and (A''-C'') TCM groups. Scale bar, 100 μ m. (D) Mean values of the integrated optical density of lipid staining per blastocyst as analyzed by ImageJ software. Columns with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

3처리구에서 생산된 수정란의 동결/융해 후 생존율을 비교분석할 결과는 Fig. 4에서와 같다. 동결융해 후 생존율은 BSA 그룹에서 가장 높았으나 유의적인 차이는 없었다. 그러나 부화율은 혈청 및 BSA 그룹이 무혈청그룹보다 높게 나타났다. 이는 수정란의 질적수준이 궁극적으로 동결융해 수정란의 부화율에도 영향을 미친다는 것을 확인할 수 있었다.

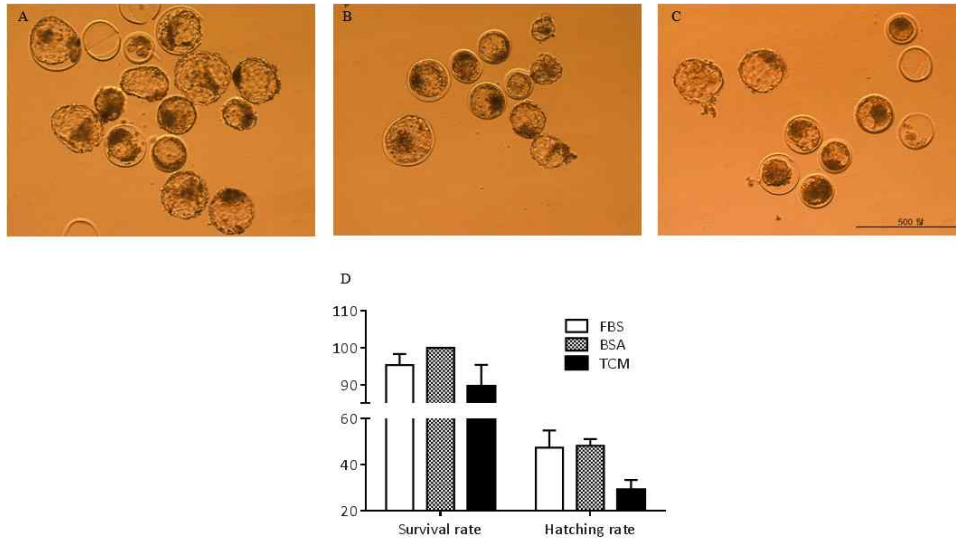


Fig 4. Survival and hatching rates of embryos at 24 h after thawing. Bright field images showing the survival and hatching rates in the (A) FBS, (B) BSA and (C) TCM groups. (D) Mean values of the survival and hatching rates.

전년도 연구 결과가 무혈청 배지를 이용한 수정란 생산의 효용성을 입증하였다면, 금년도에는 이렇게 생산된 수정란이 현장에서 문제없이 이식이 되고 수태가 되는지를 확인하였다. 특히 무혈청 배지는 혈청배지의 단점을 극복할 수 있는 기술로 현재까지 현장에 적용된 사례가 많지 않은 것이 현실이다. 본 연구실에서는 무혈청 배지를 이용한 수정란 생산 기술이 현장에 적용 될 수 있는지를 판단하기 위하여 3개 지역을 선별하여 무혈청 배지를 이용한 수정란 이식의 효용성을 보고자 하였다. 2세부의 협조를 받아 OPU기술로 난자를 채취하여 무혈청배지를 기반으로 수정란의 생산을 실시하였다. 이렇게 생산된 수정란의 공급은 A지역은 3월~7월, B와 C지역은 6월부터 현재까지 185개, 197개 및 68개를 각각 공급되고 있으며, A지역은 공급 완료와 함께 임신진단이 종료되었다. B와 C지역은 5월에서 7월까지 공급된 두수만 임신진단이 된 상태로서 공급된 수정란의 이식 후 임신감정의 결과는 Table 2과 같다.

Table 2. Pregnancy rate of OPU derived embryo transfer by no serum culture system

Area	Embryo Transfer	Pregnancy test	Pregnancy (%)
A	185	185	92 (49.7)
B	197	118	50 (42.3)
C	68	52	27 (51.9)
Total	253	355	169 (47.6)

위의 결과와 같이 수태율은 A 지역이 49.7%, B 지역이 42.3%, C 지역이 51.9%로 나타내었으며 전체적인 수태율은 47.6%로 확인되었다. 다만 B와 C city의 경우 수태율 확인을 계속하고 있으므로 임신감정이 완료되어야 정확한 결과가 나올 것으로 생각된다.

그러나 이러한 결과는 무혈청 배지를 이용한 수정란의 생산 및 이식에 대해서 기존의 혈청 배지를 이용한 수정란 이식의 수태율과 큰 차이를 보이지 않았으며, 실제 현장에 활용하는데 큰 문제는 없을 것으로 판단된다. 또한 무혈청배지 유래 수정란이식에 의한 송아지 생산에서는 혈청배지 유래 수정란이식에 의한 송아지의 거대태아 생산 및 난산에 의한 폐사 등의 근본적인 문제를 해결할 수 있음으로써 실제 산업현장에서의 적용 및 활용 가능성은 훨씬 크다고 판단된다. 현재 이식 후 임신 중인 대리모의 분만에서 난산, 거대태아 생산 및 폐사 등의 결과르 분석해 보면 무혈청 배지 유래 수정란이식의 장점으로 인식되고 있는 것이 증명될 수 있을 것이다.

○ 저온저장기술 유래 수정란의 질적 수준 분석 및 이식 현장 적용

- 전사억제인자 유래 수정란의 질적 수준 분석 및 이식 적용(소)

아래의 그림에서와 같이 전사억제인자에 4, 5, 6일 동안 저온저장 후 배양한 결과의 사진들에서 생존율은 매우 높은 것을 알 수 있다(Fig. 5). 그러나 시간이 늘어날수록 손상된 수정란의 숫자가 증가할 뿐만 아니라 부화율이 급격하게 낮아지는 결과를 보이고 있어서 이 부분의 개선이 반드시 이루어져야 할 것으로 판단된다.

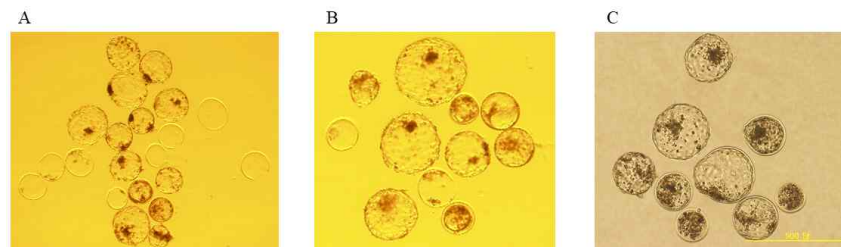


Fig. 5. Bright field image of embryos treated with anti-transcript factor after recover from low temperature storage. Embryos stored fro (A) 4 days, (B) 5 days and (C) 6 days at 4oC at refrigerator.

저온저장 기간을 증가시키기 위하여 전사억제인자를 6일 동안 처리 후 수정란에서 발현되는 PI3-K protein을 조사한 결과 하여 분석한 결과 전사억제인자를 첨가한 그룹에서 PI3-K 단백질의 발현이 유의적으로 높게 발현됨을 확인할 수 있었고, 이러한 결과는 저온저장 후 수정란의 활력도 및 발생에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Fig. 5). 즉 이와 같은 결과에서 비록 저온저장 기간이 6일까지 장기간이었지만 전사억제인자의 첨가로 수정란의 대사율을 조절하고 궁극적으로 수정란의 활력도를 높임으로써 질적수준을 높일 수 있을 것이다.

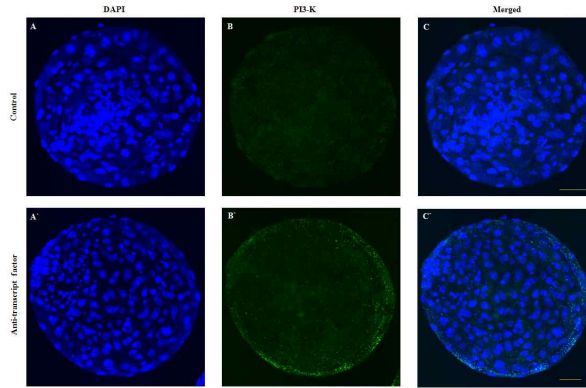


Fig. 6. Fluorescent images showing PI3-K protein expression in bovine blastocyst stored at low temp for 6 days. (A-C) control group and (A'-C') Anti-transcript factor treated blastocyst. The corresponding images were merged. Scale bar, 50 um.

저온저장 시 전사억제인자를 첨가함으로써 배반포에서 Sirt1 단백질의 발현을 향상시켜 수정란의 대사조율전자인자들의 발현을 촉진함과 동시에 난자의 활성화를 크게 향상시킨다(Fig. 7). 즉 전사억제인자를 첨가하여 저온저장 함으로써 수정란의 질을 크게 향상시킬 수 있음을 간접적으로 증명할 수 있는 것이다. 이러한 처리과정에도 불구하고 생존율은 5, 6일까지 거의 100%에 가깝지만 부화율이 크게 낮아지는 현상을 보여서 이 부분의 개선이 반드시 요구되는 것이다. 즉 부화율의 개선 없이는 수정란이식에 적용에 한계를 가질 수 밖에 없다는 것이다. 이식 후 체내에서 부화율이 증명되지 않는다면 이식 후 적당한 수준을 수태율을 얻기 위해서 부화율의 향상을 위한 기술개발에 매진해야 할 것이다.

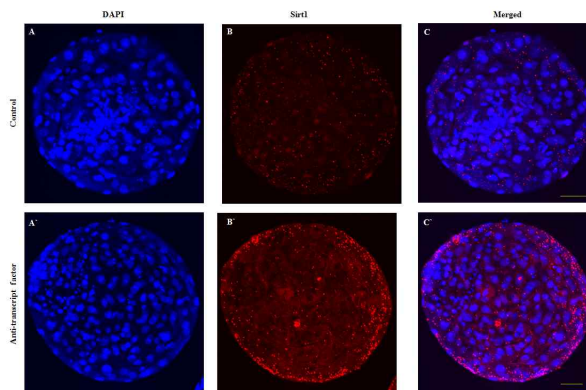


Fig. 7. Fluorescent images showing Sirt1 protein expression in bovine blastocyst stored at low temp for 6 days. (A-C) control group and (A'-C') anti-transcript factor treated blastocyst. The corresponding images were merged. Scale bar, 50 um.

- 저온저장기술 유래 수정란이식 현장 적용 (소)

1차년도 데이터에서 확인 한 바와 같이 저온저장 수정란의 질적 수준을 확인한 결과, 무혈청 배지 내에 ITS를 첨가한 그룹이 유의적으로 질적 수준이 높게 나타났다. 이를 기반으로 하여 수정란을 생산하였으며, 또한 저온 수송방법을 통한 수정란 이식의 효용성을 보고자 2개 지역을 보온 수송과 저온 수송으로 나누어 현장까지 수정란을 공급하였다. 결과는 Table 3에서와

같다.

Table 3. Pregnancy rate of OPU derived embryo transfer depend on transportation temperature

Temperature (°C) *	Embryo Transfer	Pregnancy test	Pregnancy (%)
High (Approx. 35°C)	185	185	92 (49.7)
Low (Under 5°C)	68	52	27 (51.9)
Total	253	237	119 (50.2)

* 수송온도는 보온상태 (약 35°C)와 저온상태 (약 5°C 이하)로 수송하였음.

위의 결과에서 보듯이 보온수송과 저온수송에서의 수태율은 저온수송이 소폭 높게 나타난 것으로 확인되었다. 그러나 유의적인 차이는 볼 수 없었다. 저온수송의 경우 12월 말까지 공급할 예정이나 현재까지의 결과를 보면 저온수송이 기존에 보온수송방법과 큰 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과는 보온수송의 단점인 수정란의 이식시간을 극히 제한된 시간 내에 반드시 완료해야 하는 한계점을 극복할 수 있었다. 즉 저온수송에서는 수정란의 대사율을 극히 제한함으로써 수정란을 장시간, 즉 3일까지 저장 가능하며 이들을 이식할 수 있음으로써 보온수송과 같이 수정란의 이식시간에 대한 제한을 크게 극복할 수 있음으로써 산업화 적용에 매우 용이하게 활용될 수 있을 것이다. 현재의 수준으로는 3일까지 거의 대부분 생존할 수 있고 이들을 이식에 활용할 수 있음으로써 발정동기화가 필요하지 않은 상태, 즉 자연발정우를 대상으로 수정란이식을 할 수 있는 기술적인 기반을 확보했다고 판단된다. 이러한 적용 기술은 산업화에서 엄청난 효과를 얻을 수 있다. 즉 대리모의 발정동기화 과정에서 많은 비용과 시간적 소요에 따른 경제적 비용이 지출된다는 것이다. 즉 10두의 발정동기화를 유도하면 실제 이식에 활용되는 개체는 약 6두 전후로서 그 외의 것은 그대로 공태기간으로 소요됨으로써 농가의 측면에서는 엄청난 손해를 감수해야 하는 것이다. 궁극적으로 인공수정과 같이 자연발정우를 대리모로 활용할 수 있는 기술적 적용이 가능함으로써 수정란이식에 수반되는 전체적인 비용의 경감뿐만 아니라 농가에서 부담해야할 공태기간을 획기적으로 경감시킴으로서 수정란이식의 산업화 적용에 엄청난 기술적 진보를 얻을 수 있는 것이다. 또한 발정동기화에 필요한 다양한 호르몬의 주사제, 시간적 비용 등을 고려하면 자연발정우를 이용할 수 있다는 것은 큰 의미를 가질 수 있다. 궁극적으로 저온수송에 의한 장기간의 보존에 의한 자연발정우에 수정란이식을 할 수 있는 기술개발은 산업화에 엄청난 기여를 할 수 있는 기술개발로 판단된다.

○ 전사억제인자 유래 수정란의 질적 수준 분석 및 이식 적용(쥐)

전사억제인자 첨가에 의한 장기간 저온저장 수정란의 질적수준을 분석하기 위해서 6일간 저온저장 후 생존율과 부화율을 생쥐에서 분석한 결과는 Table 4, Fig. 8에서와 같다. 생존율은 전사억제인자의 첨가군에서 5일까지 100%, 6일째 99.1% 생존율을 보여 대조군에 비해 유의적으로 높은 생존율을 보였다. 부화율에서도 대조군에 비해 높았으나 전반적으로 부화율이 낮은

수준을 보였다. 이러한 결과는 저온저장 후 생존율뿐만 아니라 부화율의 개선하기 위한 새로운 기술개발이 반드시 필요함을 알 수 있다. 왜냐하면 이식 후 부화되지 않는 수정란은 절대 착상을 할 수 없을 것이고, 본 연구의 목적이 수정란의 향상하기 위한 기술개발임으로 이것의 해결은 실질적으로 현장에서 적용할 수 있는 기술개발을 위해서 부화율을 어떻게 개선할 것인가에 대한 연구개발이 3차년도에 집중적으로 수행해야 할 것으로 판단된다.

Table 4. Survival and hatching rates of embryos at 24 h after recovery.

Group	Paused duration (days)	No. of chilled embryos	No. of survived embryos (% ± SE)	No. of hatched embryos (% ± SE)
anti-transcript factor	1	32	32 (100 ± 0)	9 (28.2 ± 1.6)
	2	35	35 (100 ± 0)	8 (22.7 ± 2.5)
	3	32	32 (100 ± 0)	7 (21.8 ± 1.6)
	4	40	40 (100 ± 0)	8 (20.1 ± 5.1)
	5	39	39 (100 ± 0)	8 (20.8 ± 5.7)
	6	137	136 (99.1 ± 2.6)	29 (21.6 ± 15.1)
Control	1	28	28 (100 ± 0)	5 (17.5 ± 2.9)
	2	24	24 (100 ± 0)	5 (15 ± 13.2)
	3	33	31 (94.4 ± 4.9)	4 (13.1 ± 6.1)
	4	39	33 (84.4 ± 8)	3 (9.2 ± 1.3)
	5	35	29 (83.3 ± 28.9)	2 (8.6 ± 8.3)
	6	108	68 (57.2 ± 23.3)	7 (8.9 ± 6.7)

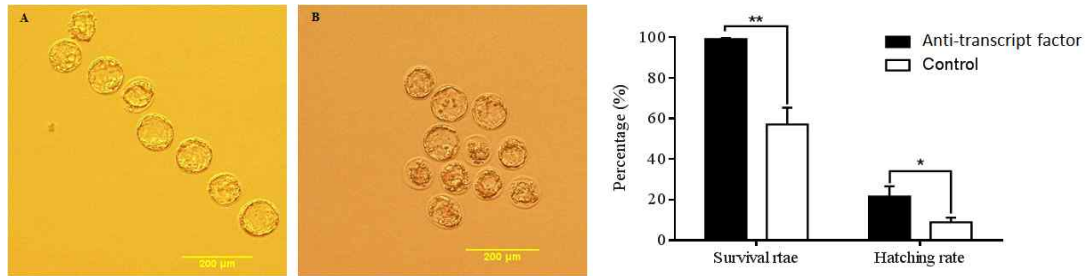


Fig. 8. Survival and hatching rates of embryos at 24 h after recovery. Bright field images showing the survival and hatching rates in the (A) anti-transcript factor treated and (B) control groups. (C) Mean values of the survival and hatching rates. The asterisk indicates a significant difference ($P < 0.05$) and double asterisk indicates a significant difference ($P < 0.01$).

처리구에 따른 수정란이식의 결과는 Fig. 9에서와 같다. 임신율은 신선란이 전사억제인자 및 대조군보다 유의적으로 높았으나, 전사억제인자 처리군과 대조군과는 유의적인 차이가 없었다. 그러나 실제 산자생산율에서는 신선란 처리군이 전사억제 처리군과 대조군보다 유의적으로 높았으나, 전사억제 처리군이 대조군보다 유의적으로 높은 결과를 보였다. 또한 임신기간이 2 처리군이 신선란보다 약 1일정도 더 길었다는 것이 매우 흥미로운 결과였다. 이러한 결과를 분석하면 저온저장한 수정란은 처리구에 관계없이 본래의 신선란과 같은 대사율로 회복하는데 비록 체내일지라도 상당한 시간이 소요된다는 것을 예측해 볼 수 있는 것이다. 즉 이 부분에서 상당한 근거를 찾을 수 있고 향후 개선방안을 찾을 수 있을 것으로 판단된다.

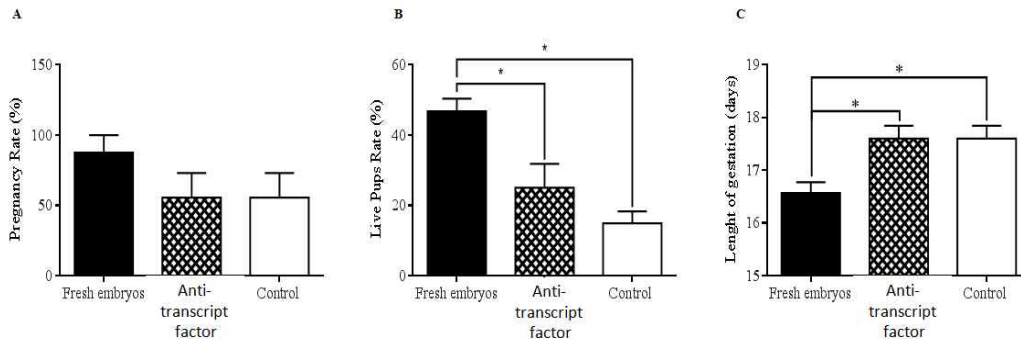


Fig. 9. Reproductive performance after NSET of fresh-non paused and 6 days paused embryos. (A) Mean values of pregnancy rate in different experimental groups. (B) Mean values of live pups rate in different experimental groups. The asterisk indicates a significant difference ($P < 0.01$).

○ 수정란의 자궁외기질 침투능력 체외분석기법 및 기반기술 확립(쥐)

수정란이식에 의한 착상율을 높이기 위한 연구로서 수정란의 착상과정에서 수정란으로 분비되는 MMP-2 & -9의 발현으로 자궁외기질에 침투 및 착상할 수 있는 것이다. 실제 이식, 즉 착상 초기에 자궁 내에서 분비되는 MMP-2 & -9의 농도를 확인하고 가장 적합한 농도를 찾고 이 농도로 수정란이식 시 적용함으로써 착상율을 개선하기 위한 연구를 진행하였다. 이러한 기본 데이터를 확보하기 위하여 생쥐에서 실험을 실시하여 전반적인 시스템을 구축하고 그 기반기술을 소에 적용하기 위해서 생쥐에서의 결과를 얻기 위한 실험을 수행한 결과는 Fig. 11에 서와 같다.

첫 번째로 자궁 내에 분비되고 있는 MMP-2 & -9의 적정농도를 확인한 결과는 Fig. ?에서와 같이 수정 후 2.5일에 MMP-2와 MMP-9에서 각각 약 250 ng/ml, 4 ng/ml의 농도를 확인할 수 있었다. 즉 생쥐에서는 MMP-2가 훨씬 높게 발현됨을 알 수 있었고, 수정 후 2.5일째에 다른 발정기, 수정 후 3.5일째 보다 유의적으로 높은 농도로 발현됨을 또한 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 생쥐에서는 MMP-2가 MMP-9보다는 초기 착상과정에 훨씬 더 유의적인 영향을 미침을 예상할 수 있는 결과로서 큰 의미를 가지고 있다. 또한 MMP-9은 수정 후 2.5일째 가장 높은 4 ng/ml 농도로 발현되고 있지만 발정기와 수정 후 3.5일째의 낮은 농도에 비해 그 발현농도가 높지 않음을 볼 때 착상 초기에 크게 영향을 미치지 않는 것으로 예상된다.

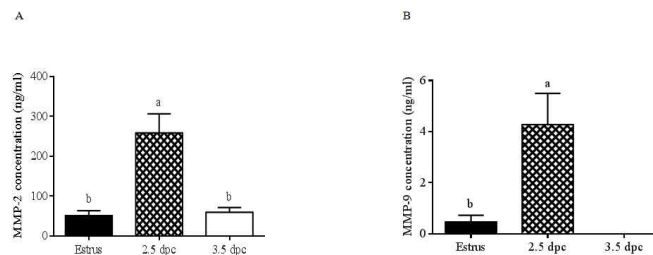


Fig. 10. Protein level of MMP-2 and MMP-9 in uterine fluid. Concentrations of (A) MMP-2 and (B) MMP-9 in uterine fluid at estrus phase, 2.5 dpc and 3.5 dpc. Columns with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$). The data are presented as the mean \pm standard error (SE).

수정란의 착상을 체외에서 검정할 수 있는 방법인 배반포의 침투능력을 MMP-2 & -9의 적정농도, 즉 MMP-2 100 ng/ml, MMP-9 10 ng/ml 농도를 대조군과 비교해 본 결과 약 3배와 2배 정도의 배반포 침투능력의 향상을 보였다(Fig. 11). 이러한 결과는 자궁내막에서 분비되는 MMP-2 & -9뿐만 아니라 배양액에 적정 농도를 추가하여 배양 시 수정란의 침투능력이 3배와 2배가 높아짐을 확인한 결과이다. 이러한 결과를 기반으로 수정란이식 시 MMP-2 & -9을 적정 농도를 첨가하여 이식한다면 착상율의 향상을 얻을 수 있을 것으로 예상된다.

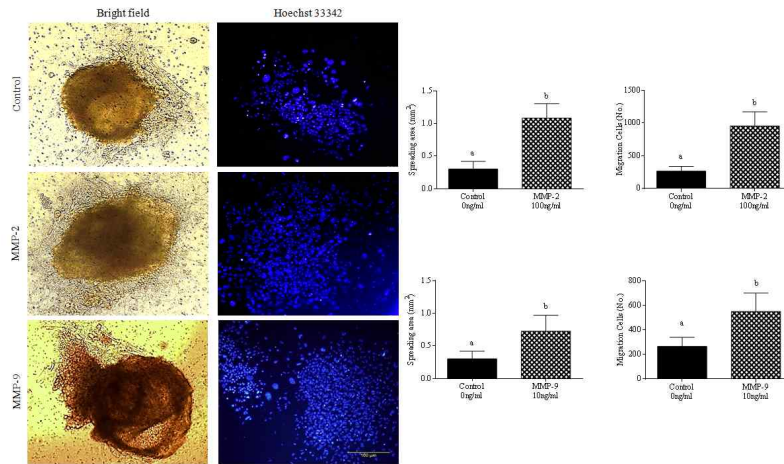


Fig. 11. Effect of optimal concentration of MMP-2 & MMP-9 treatment on the mouse blastocyst invasion ability. Day 10.5 mouse embryos stained with Hoechst 33342 to determine the total migration cells numbers at (A-A') control, (B-B') MMP-2 and (C-C') MMP-9 groups. Mean values of spreading area (D) and total migration cells numbers (E) in MMP-2 experimental group. Mean values of spreading area (F) and total migration cells numbers (G) in MMP-9 experimental group. Columns with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$). The data are presented as the mean \pm SE.

실제 적정 농도, 즉 100 ng/ml MMP-2, 10 ng/ml MMP-9을 각각 이식 시 첨가한 결과 임신율은 MMP-2 & -9에 따른 변화가 없었다(Fig. 12). 그러나 생쥐의 새끼 분만율은 MMP-2 & -9을 첨가하여 이식한 그룹에서 유의적으로 높은 성적을 얻었다. 수태율에는 큰 차이를 볼 수 없었으나, 수정란의 착상 개체수는 유의적으로 증가하는 경향을 보여서 실제 이들이 초기 착산과정에 중요한 기능을 함을 확인할 수 있었다.

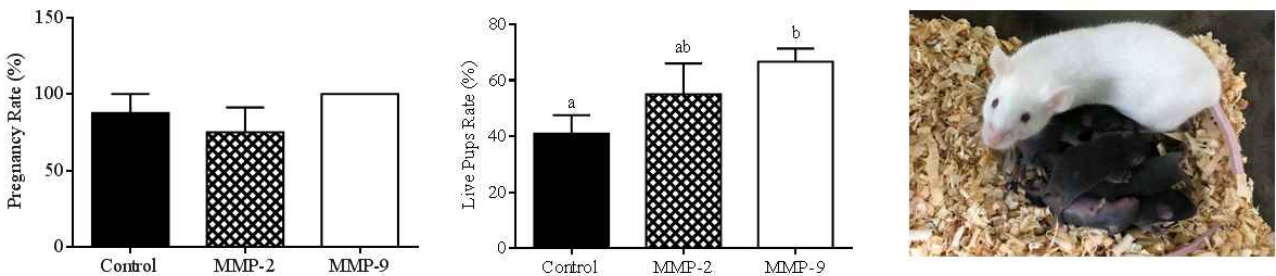


Fig. 12. The reproductive performance of the control group and co-transfer MMP-2 & MMP-9 groups. The MMP-2 concentration was 100 pg/ml, and the MMP-9 concentration was 10 pg/ml. The MMP-2 group pregnancy rate was lower than that in the other group, the MMP-9 group pregnancy rate was higher than that in the other group, and the pregnancy rate was 100% (A). Live pups from the co-transfer group and MMP groups (B). A picture of an ICR recipient and C57BL/6 embryo transferred pups (C). The data are presented as the mean \pm standard error (SE).

○ 수정란의 자궁외기질 침투능력 체외분석기법 및 기반기술 확립(소)

소 수정란의 13일째 장기배양에서 부착된 것과 부착되지 않은 수정란에서 다양한 유전자의 발현을 비교분석한 결과 MMP-9, MMP-2, OCT4, SOX2 에서는 유의적으로 부착된 수정란에서 높게 발현됨을 확인할 수 있었다(Fig. 13). 그러나 BAX의 경우에는 비부착된 수정란에서 유의적으로 높게 발현됨을 알 수 있었고, BCL2는 처리구 간에 유의적인 차이가 발견되지 않았음을 확인함으로써 수정란의 질적수준을 간접적으로 비교분석할 수 있었다. 즉 13일째의 수정란에서 부착되는 수정란이 질적수준이 높음을 알 수 있었다. 그때까지 부착되지 못한 수정란의 경우에는 사명유전자인 BAX 유전자가 높게 발현됨을 확인함으로써 부화 후 적정 기간에 수정란의 착상됨으로써 수정란의 질적 수준을 유지함을 확인할 수 있었다.

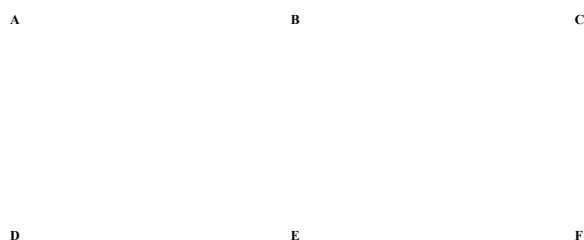


Fig. 13. Relative mRNA levels of various genes at day 13 IVP blastocysts as determined by RT-qPCR. Relative mRNA levels of (A) *MMP9*, (B) *INFt*, (C) *OCT4*, (D) *SOX2*, (E) *BAX*, (F) *BCL2*, in attached and non attached blastocysts after 5 days from culture.

소의 수정란에서는 MMP-2 유전자 발현여부를 확인하고자 부착 및 비부착 수정란의 MMP-2 유전자의 발현을 검정한 결과 부착수정란에서 높게 발현되었으나 유의적인 차이는 없었다(Fig. 14). 또한 D-8 배반포와 D-13일 부착수정란에서 MMP-2 유전자 발현을 비교한 결과 D-8 수정란에서 유의적으로 높게 나타났다. 이러한 결과는 초기 수정란에서 MMP-2 유전자의 발현이 훨씬 강하게 발현됨을 확인할 수 있었다.

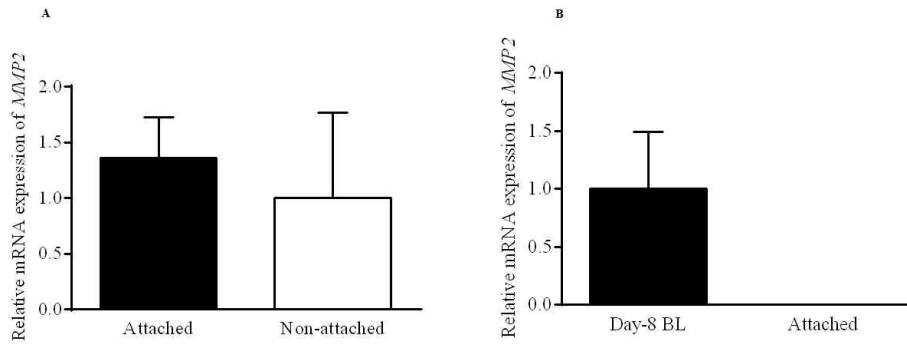


Fig. 14. Relative mRNA levels of *MMP2* in (A) attached and non attached blastocysts after 5 days from culture (B) day-8 blastocyst and attached blastocysts after 5 days from culture as determined by RT-qPCR.

Day 13일째 부착, 비부착 수정란과 Day-8일째 수정란에서 MMP-2, MMP-9, INFt 유전자의 발현을 비교분석한 결과는 MMP-9 유전자가 부착수정란에서 상대적으로 높게 발현되었고, MMP-2 유전자의 Day-8일째 수정란에서 유의적으로 높게 발현되고 있음을 알 수 있었으나, MMP-9의 경우에는 상대적으로 Day-13 부착 및 비부착 수정란보다 낮게 발현됨을 알 수 있었다(Fig. 15). 이러한 결과는 소의 경우는 생쥐와 달리 MMP-9이 초기 착상과정에 중요하게 영향을 미침을 알 수 있었다.

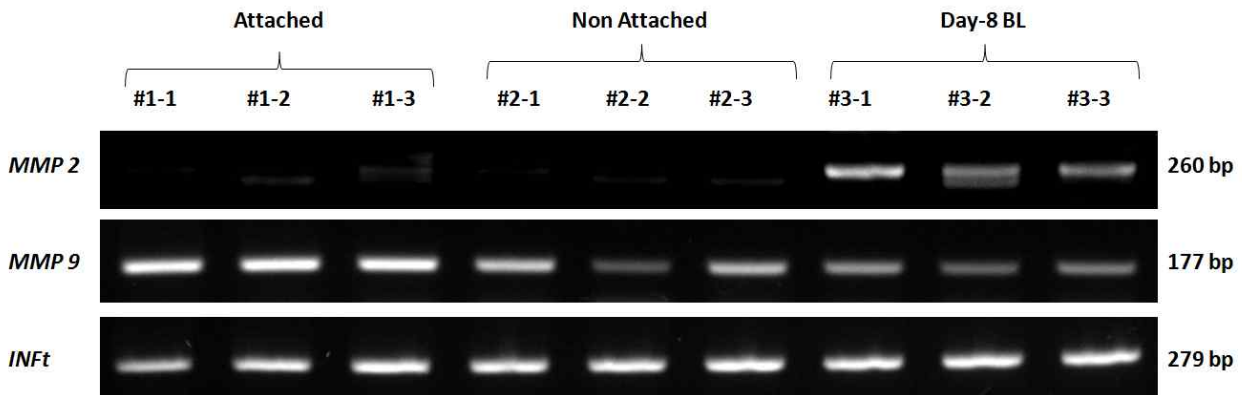


Fig. 15. RT-PCR analysis of the expression of selected genes at day 13 IVP blastocysts

MMP-2 & -9의 단백질 발현을 분석하기 위해 western blot을 실시한 결과 유전자의 발현과 유사하게 MMP-2의 경우에는 Day-8일째 가장 강하게 발현되고 있었으며, MMP-9의 경우에는 부착된 수정란에서 비부착과 Day-8일째의 수정란보다 유의적으로 높게 발현됨을 알 수 있었다(Fig. 16). 이러한 결과에서 소의 경우에는 착상시기인 Day-13일째 MMP-9이 매우 강하게 발현됨으로서 실제 초기 착상과정에서 MMP-9의 중요성을 확인할 수 있었다.

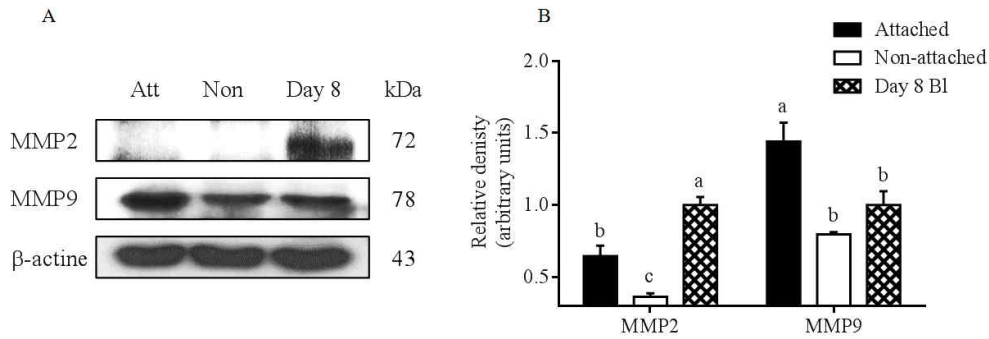


Fig. 16. Western blot analysis of day 8 pre-implantation and day 13 post-implantation bovine embryos (A) representative western blot image (B) Quantification of MMPs protein level after western blot analysis of day 8 pre-implantation and day 13 post-implantation bovine embryos (10 μ g/lane). The data were processed using ImageJ software. The asterisk indicates a significant difference ($P < 0.01$).

Day-13일의 수정란의 부착된 세포에서 세포수와 MMP-9 and -2의 발현을 확인한 결과 MMP-9이 훨씬 많이 발현됨을 확인할 수 있었다(Fig. 17). 이와같은 결과에서 소에서는 MMP-9이 훨씬 중요한 기능을 함을 확인할 수 있었다. 생쥐에서와 반대로 MMP-9이 초기 착상과정에서 중요한 기능을 함을 확인함으로써 차후 이식과정에서 이들의 활용한 이식으로 초기 착상율의 향상에 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

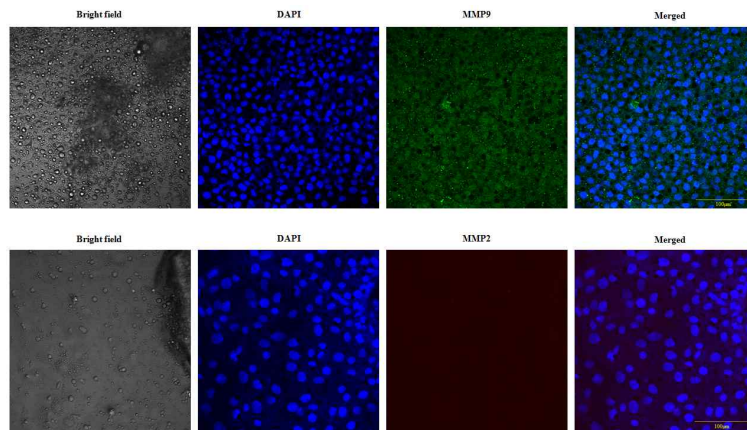


Fig. 17. Representative confocal Z sections of day 13 IVP blastocysts fixed and immunostained for MMP2 and MMP9 protein expression. Scale bar, 100 μ m.

2. <2세부(경상대학교) 난포파동주기 유래 OPU 수정란생산의 현장적용기술 확립>

○ 적정 난포파동주기 유래 GVII 단계난자 채취효율 비교분석

난포파동주기에 따른 GVII 단계의 난자 채취를 위하여 전년도에 사용한 공란우 6두 외에 2두를 추가하여 총 8두를 대상으로 채란을 실시하였다. 공란우는 최초 대난포 제거를 위한 작업을 1회 실시 한 후 3회 채란(주 1회)을 실시하였다. 채란된 난자는 GV단계(Fig. 1.) 분석을 위하여 염색을 실시하였으며 이를 통하여 GVII 단계의 난자의 채란효율을 확인하였다. 염색된 GV단계의 결과는 Table 1와 같다.

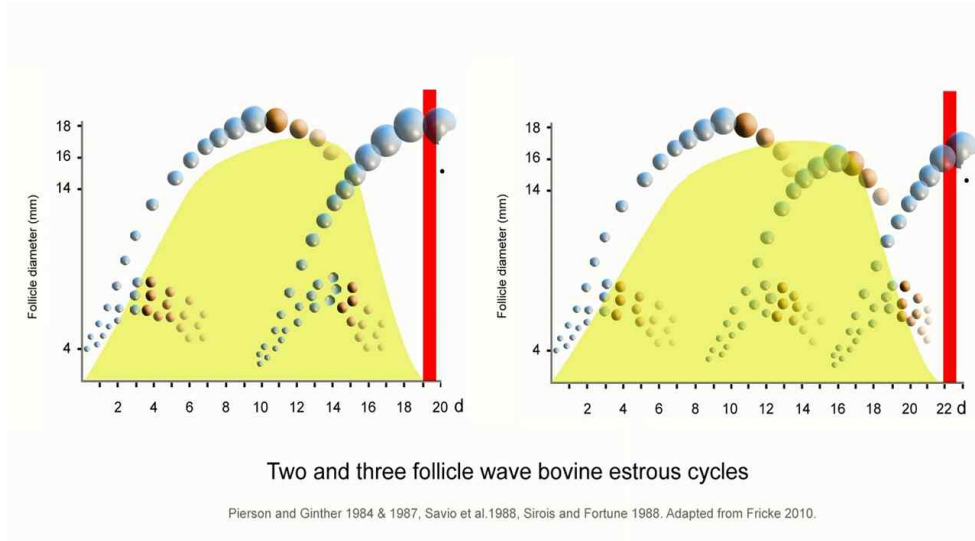


Fig. 1. Comparison of 2 or 3 follicular wave cycle in the donors.

Table 1. Comparison of GV stage oocytes from 8 different donors

Donor #	GV stage (%)				
	Total	GV0	GV1	GV2	GV3
8802	31	0 (0.0)	14 (45.2)	13 (41.9)	4 (12.9)
3962	45	0 (0.0)	19 (42.2)	21 (46.7)	5 (11.1)
5101	43	0 (0.0)	18 (41.9)	23 (53.5)	2 (4.7)
3472	35	1 (2.9)	26 (74.3)	7 (20.0)	1 (2.9)
0353	36	0 (0.0)	13 (36.1)	19 (52.8)	4 (11.1)
5610	65	2 (3.1)	16 (24.6)	41 (63.1)	6 (9.2)
9047	45	0 (0.0)	6 (13.3)	37 (82.2)	2 (4.4)
7570	66	4 (6.1)	20 (30.3)	40 (60.6)	2 (3.0)

염색을 통하여 각 GV 단계의 난자를 확인한 결과 5101, 0353, 5610, 9047, 7570에서 50%가 넘는 GV2 단계의 난자를 확인하였다. 그러나 전년도 자료에서는 5101 개체는 50% 이하로 나타내었으며 이상의 결과를 통하여 2 follicular wave (8802, 3962, 5101, 3472)와 3 follicular wave (0353, 5610, 9047, 7570)로 분류하였다. 각 그룹에서 채란 될 수 있는 GVII 난자의 효율을 보기 위하여 2 follicular wave 그룹은 10~11일 간격으로 채란을 실시하였으며, 3 follicular

wave 그룹은 1주일 단위로 채란을 실시하였다. 그룹별 GVII 단계 난자의 채란율은 Table 2과 같다.

Table 2. Comparison of GV stage oocytes 2 follicular with 3 follicular wave donors

Follicular wave	Donor #	GV stage (%)			
		TOTAL	GV1	GV2	GV3
	8802	16	16 (61.5)	8 (30.8)	2 (7.7)
2	3962	12	12 (44.4)	13 (48.1)	2 (7.4)
follicular wave	5101	15	15 (37.5)	24 (60.0)	1 (2.5)
	3472	19	19 (50.0)	16 (42.1)	3 (7.9)
	합계	131	62 (47.3)	61 (46.6)	8 (6.1)
	0353	58	8 (13.8)	37 (63.8)	13 (22.4)
3	5610	88	11 (12.5)	53 (60.2)	24 (27.3)
follicular wave	9047	52	5 (9.6)	31 (59.6)	16 (30.8)
	7570	150	22 (14.7)	89 (59.3)	39 (26.0)
	합계	348	46 (13.2)	210 (60.3)	92 (26.4)

위의 결과와 같이 3 follicular wave 그룹의 경우 GVII 단계에서 약 60.3%의 GVII 난자가 채란되는 것을 확인 하였으나, 2 follicular wave 그룹에서는 GVII 단계의 난자가 5101에서만 60.0%로 확인 되었으며 나머지 개체에서는 낮은 수치를 확인하였다. 이러한 결과는 3 follicular wave를 나타내는 공란우의 선발은 가능하나, 2 follicular wave의 경우에는 선발에 어려움이 있을 것으로 생각되며 난자의 채란 효율 면에는 3 follicular wave 그룹이 더 효율적인 것으로 판단된다.

본 연구에서는 호르몬을 전혀 투여하지 않고 오직 난포파동에 의한 2 or 3 follicular wave를 분류하였으며, 이들로부터 난자의 생산, 생산된 난자의 grade 분류 등을 실시한 결과 3 follicular wave의 경우 난자의 생산효율을 얻을 수 있었으나, 2 follicular wave의 경우에는 좋지 못한 성적을 얻었다. 이러한 결과는 공시한 개체수의 한계로 더 많은 공란우의 개체수를 활용한 연구가 필요하다고 판단된다.

○ GVII 단계 난자유래 OPU 수정란 생산효율 비교분석

GVII 단계 난자유래 수정란 생산효율을 알아보기 위하여 위의 결과를 토대로 3 follicular wave 그룹(4두)의 공란우에서 체외수정란의 생산 가능성을 비교실험을 실시하였다. 채란은 총 35회 실시하였으며 그 결과는 다음과 같다(Table 3).

Table 3. Oocytes' grade from 3 follicular wave donors

Follicular wave	Follicle # (Mean)	Oocyte # (Mean)	Oocytes grade			
			Grade 1 (% , Mean)	Grade 2 (% , Mean)	Grade 3 (% , Mean)	Grade 4 (% , Mean)
3 follicular wave	1621 (46.3)	762 (21.8)	63 (8.3, 1.8)	113 (14.8, 3.2)	559 (73.4, 16.0)	28 (3.7, 0.8)

회수된 총 난자 수는 762개로 확인 되었으면 회당 21.8개의 난자가 회수되었다. 1등급 난자는 63개(8.3%), 2등급은 113개(14.8%) 3등급은 559개(73.4%) 4등급은 28개(3.7%)로 확인 되었다. 3 follicular wave 그룹에서 생산된 수정란의 효율은 다음과 같다(Table 4).

Table 4. Blastocyst production efficiency of 3 follicular wave derived oocytes

Follicular wave	Oocyte # (Mean)	Cleavage # (% , Mean)	Blastocyst # (% , Mean)
3 follicular wave	762 (21.8)	480 (63.0%, 13.7)	232 (30.4%, 6.6)

공시된 762개의 난자에서 분할율은 480개(63.0%), 총 생산된 수정란은 232개(34.0%)로 확인 되었으며 회당 평균 6.6개의 수정란이 생산되었다. 이와 같은 성적은 기존의 OPU 유래 수정란의 생산효율보다 유의적으로 높은 수치이며, 과배란 처리에 의한 수정란의 생산에서 1회 채란과 유사하거나 높은 결과이다. 즉 3 follicular wave를 이용한 채란은 호르몬 처리를 전혀하지 않고 자연적으로 난포과동을 이용한 GV2난자를 채취하여 수정란을 생산함으로써 이식 가능한 수정란을 유의적으로 높은 생산효율을 얻을 수 있었다. 이러한 것은 궁극적으로 노동력을 경감하고 공란우의 스트레스를 줄여주면서 수정란을 효율저그로 채란 및 생산함으로써 전반적인 활용 가능성 및 산업화 적용 가능성이 매우 높은 기술로 평가된다. 또한 2 follicular wave의 공란우에서도 수정란 생산효율을 비교 분석해야 하나 정확하게 분류가 불가능하여 과동 주기를 찾는데 계속적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

본 연구실에서 OPU 유래 수정란 이식사업도 진행하고 있으며 우수한 형질의 공란우 3두를 선별하여 사용하였다. OPU 채란은 첫 입식 후 대난포 작업을 1회 실시한 후 주 2회 실시 (Table 5)하였다.

Table 5. OPU derived oocyte recovery rate by conventional OPU session system*

OPU session	Follicle # (Mean)	Oocyte # (Mean)	Grade of oocyte recovered			
			Grade 1 (% , Mean)	Grade 2 (% , Mean)	Grade 3 (% , Mean)	Grade 4 (% , Mean)
154	3849 (25.0)	2176 (14.1)	218 (10.0%, 1.4)	396 (18.2%, 2.6)	1457 (67.0%, 9.5)	105 (4.8%, 0.7)

* H 군의 데이터를 정리한 것임.

채란된 수정란은 연구실로 수송하여 수정란 생산에 사용 하였으며 생산된 수정란은 상태에 따라 3등급으로 분류하여 A등급의 수정란만 선별하여 이식에 사용하였다. 수정란 이식 사업은 2018년 3월부터 11월까지 진행되었으며 결과는 다음과 같다(Table 6). 수태율은 이식 완료 후 진행됨으로 그에 대한 자료는 차년도에 결과를 기재하도록 하겠다.

Table 6. Summary of OPU embryo production and embryo transfer*

OPU session	Oocytes # (Mean)	Cleavage # (%, Mean)	Blastocyst # (%, Mean)	ET #
154	2176 (14.1)	1621 (74.5%, 10.5)	633 (29.1%, 4.1)	413

* H 군의 데이터를 정리한 것임.

이상의 결과를 종합해 보면 기존에 본 연구실에서 주 2회 채란하여 수정란을 공급하는 것이 follicle wave를 확인하여 생산 및 이식하는 방법에 비하여 산업화에 적용이 쉬운 것을 확인하였다. Follicle wave를 적용하면 회당 수정란 생산율은 높일 수 있으나 GVII 단계를 분석하는데 많은 시일(2~3주 이상)이 소요되며 현장에서 실질적으로 공란우를 사용 할 수 있는 기간이 줄어들기 때문인 것으로 생각된다. OPU 수정란 생산에 사용되는 공란우는 채란 시작 후 4개월부터 수정란 생산율이 낮아지기 때문에 연구적인 성과로서는 회당 생산율을 높이는 장점이 존재하나 대리모의 대기시간이 길어지는 단점이 있기 때문이다.

3. <1협동(경상남도 축산연구소) : 수태율 향상을 위한 대리모의 사양관리 및 선발기준 확립>

○ 사양시험 : 베타카로틴 생체내 안정성 검증 및 보호처리방법에 따른 적정급여형태 결정 규명

- 베타카로틴은 비타민 A전구물질로서, 베타카로틴 1 mg은 비타민 A 400 IU의 활성을 가진다. 이는 시각, 성장, 번식 및 상피조직의 유지에 필수적이며, 특히, 번식과 관련하여 난소의 황체에 많이 존재할 때 수태율이 향상되는 것으로 알려져 있음(Hurley and Doane, 1989).
- 하지만, 대리모(번식우)에서 베타카로틴의 요구량과 반추위내 안정성이 거의 보고된 바 없거나, 명확하지 않아, 본 연구진의 1년차 연구에서 현행 시판되는 베타카로틴 첨가제제(보조사료)의 효능을 검증해 본 결과, 무급여구와 비교하여 혈중 농도의 유의한 차이가 나타나지 않았으며, 비타민A로의 전환을 통한 혈중 retinol농도 증가현상도 나타나지 않음에 따라, 섭취하는 대부분의 베타카로틴 보조사료는 반추위에서 분해되던지, 또는 소장내 흡수가 이루어지지않고 대부분이 분변으로 배설되는 것으로 생각됨.
- 이에 따라 농가에서는 효능이 없는 제품을 무분별하게 급여하고, 이를 통한 농가의 암소 수태율향상의 기대심리만 조장할 뿐, 어떠한 효과 없이 생산비만 증가시키고 있는 실정임.
- 또한, 보조사료형태의 베타카로틴은 반추위내 보호되지 않은 상태에서 반추위 내 분해율이 약 50% 이상의 높은 수준으로 분해되는 것으로 보고되어(Nozière, 2006), 반추위 및 십이지장 이후 소장까지 안정적으로 이행할 수 있도록 하는 보호처리가 요구됨.
- 따라서, 본 연구에서는 본 연구진에 의해 개발된 반추위 보호 베타카로틴제제(Protected-BC)를 기존의 비보호 제제(Unprotected BC) 및 베타카로틴+비타민A 복합보호제제(protected BC+VA)와 비교하여 한우 암소의 장내 흡수 및 혈중 대사물질을 조사하였음. (사양시험 II)

연구 수행 방법

1. 공시축 배치 및 사양관리

- 공시축으로 가임암소 12두(개시체중; 433.97±6.61kg)를 선정 한 후, 처리구간 개시체중의 차이가 크지 않도록 총 4개의 우방(4×8m)에 각 3두씩 배치하였고, 물은 자유롭게 섭취할 수 있게 하였다.
- 처리구는 대조구(BC무첨가구), rumen unprotected BC급여구, rumen protected BC급여구, rumen protected BC+비타민A급여구(200 g/일)로 총 4개의 처리구로 구분하였으며, 처리구당 3두씩 공시하여 3-replicated 4×4 Latin square design으로 사양시험을 실시하였다. 각 period는 4주로 하였고, 총 4 period 16주간 사양시험을 실시하였다.
- 본 연구에 사용된 비보호제품은 Lucarotin®(β-carotene 10%, BASF, Germany) 원재료로 사용하였고, 대조구와 비보호제품급여구는 에너지를 맞추기 위하여 Energy booster100®(Hubbard Feeds, USA)를 급여하였다.
- 본 연구진에 의하여 개발된 rumen protected BC 및 BC+비타민A급여구는 현재 특허출원 및 심사단계에 있으므로 공개하지 않는다.
- 보호 및 비보호 관계없이 β-carotene급여구는 1일 두당 400mg 섭취하도록 급여하였고, 보호

BC+비타민A급여구의 비타민 A급여량은 1일 두당 30,000IU를 보호형태로 추가 급여하였다.

- 비타민 A혼합구를 설정한 것은 체내에 보다 많은 비타민A를 축적시켜 체내 retinol농도를 증가시켜 생체 비타민 A상태를 원활하게 하여, β -carotene의 비타민A로 전환비율(conversion rate of BC to vitamin A)을 낮추기 위함이다.
- 사양시험이 진행되는 동안, 사료는 1일 2회 아침, 저녁으로 나누어 급여하였고, 매일 급여량과 잔량을 기록하여 사료섭취량을 조사하였다. 그리고 영양소섭취량을 조사하기 위하여 매주 1회 급여사료를 채취하여 수분과 영양소함량을 분석하였다.
- 시험사료는 섬유질배합사료공장에서 생산되는 TMR을 기본으로 사용하였으며, 비보호 및 보호지방 그리고 개발된 반추위 보호 β -carotene을 탑드레싱(top-dressing)하여 급여하였다. 이들 실험사료의 일반성분은 표1에 나타내었다.
- 실험이 진행되는 동안, 각 period의 26, 27일 및 28일째 채혈을 각 1회씩 총3회에 걸쳐 실시하였고, 채취된 혈액은 아이스박스에 넣어 실험실로 운반하였고, 빛이 차단된 환경에서 혈장을 분리하였다.

Table 1. Chemical composition in experimental diets

Items	Treatments			
	Control	Unprotected BC	Protected BC	Protected BC + Vitamin A
	% of dry matter			
Dry matter, %	62.39	62.39	62.39	62.39
Organic matter, %	90.82	90.82	90.82	90.82
Crude protein, %	12.14	12.14	12.14	12.14
ADF ¹⁾ , %	25.24	25.24	25.24	25.24
NDF ²⁾ , %	44.91	44.91	44.91	44.91
Ether extract, %	8.73	8.73	8.73	8.73
Crude fiber, %	20.71	20.71	20.71	20.71
Non-fibrous carbohydrate, %	48.38	48.38	48.38	48.38
Crude ash, %	9.18	9.18	9.18	9.18
Calcium, %	1.57	1.57	1.57	1.57
Phosphorus, %	0.59	0.59	0.59	0.59
Beta-carotene, mg/kg	0.59	74.69	74.61	74.72
Vitamin A ³⁾ , IU/kg	5,619	5,619	5,619	10,848
TDN ⁴⁾ , %	70.65	70.65	70.65	70.65
DE ⁵⁾ , Mcal/kg of DM	3.12	3.12	3.12	3.12
ME ⁶⁾ , Mcal/kg of DM	2.55	2.55	2.55	2.55

¹⁾acid detergent fiber; ²⁾neutral detergent fiber; ³⁾total digestible nutrients; ⁴⁾digestible energy; ⁵⁾metabolisable energy. Both DE and ME values were calculated as described in Korean Feeding Standard for Hanwoo (2007)

2. 채혈, 비타민 A, 베타카로틴 및 혈액성분 분석

□ 채혈

- 모든 공시축의 혈액(10ml)을 채취하였으며, 혈액은 경정맥을 통하여 채취하였다.
- 채취된 혈액은 빛과 온도에 의한 베타카로틴 및 비타민 A의 파괴를 막기 위하여 즉시 알루미늄호일(aluminum foil)로 튜브를 감싼 후 얼음박스에 넣어 실험실로 운반하였다.
- 운반된 혈액샘플은 외부 빛이 완전 차단된 실험실에서 원심분리기를 이용하여 3,000×g에서 10분 동안 원심분리 후 상층액 2ml를 튜브에 저장한 후, 즉시 -80℃ 저온냉장고에 분석 시까

지 보관하였다.

□ 비타민 A 분석

- 비타민 A는 혈중 retinol을 분석하였으며, HPLC(Perkinelmer, Series 200, USA)를 이용하여 분석하였으며, 분석방법을 요약하면 다음과 같다.

- 혈청 200 μ l, internal standard 20 μ l 및 kit 용액 I 25 μ l을 갈색병에서 혼합시킨 후 400 μ l의 kit 용액 II를 혼합하여 9,000 \times g에서 10분간 원심분리 후 상층액 50 μ l를 HPLC에 주입하여 분석하였다.

□ 베타카로틴 분석

- 베타카로틴은 Ethanol을 이용하여 serum 속의 protein을 제거한 후 혈장내의 β -carotene을 hexane으로 추출하여 450nm에서 UV/VIS spectroscopy(Libra, Biochrom, UK)를 이용하여 흡광도를 읽어 분석하였다.

□ 혈액성분 분석

- 혈장 내 단백질, glucose, creatinine, 요소태질소(BUN), triglyceride, total cholesterol, HDL 및 LDL-cholesterol농도는 자동혈액분석기를 이용하여 분석하였다.

3. 통계분석

- 모든 자료는 SAS(SAS Institute, 2011)의 MIXED procedure를 이용하여 분석하였다.

- 모델식은 다음과 같다. 반복적으로 혈액을 채취하여 분석한 항목(비타민 A, β -carotene 및 혈액대사물질)에 대하여는 다음의 모델 repeated measures를 적용하였다. 아울러 공분산구조(covariance structure)는 AR(1)을 적용하여 분석하였다.

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \tau_l + (\gamma\tau)_{kl} + e_{ijkl}$$

Y_{ijkl} 는 종속변수, μ 는 전체평균값, α_i 는 임의효과로서 i 번째 동물효과, β_j 는 j 번째 period효과, γ_k 는 k 번째 처리구효과, τ_l 는 l 번째 시간효과, e_{ijkl} 는 잔차

- 평균값은 LSMEANS procedure를 이용하여 산출하였다. 유의성은 P값 0.05이하일 때 유의성이 인정되고, 경향은 0.10이하로 인정하였다.

연구 수행 결과

1. 혈중 β -carotene 및 비타민 A 농도

- 표에서 보는 바와 같이 β -carotene농도는 보호처리구(protected BC 및 BC+Vitamin A)에서 각각 131.96 및 133.44 μ g/dl로 무첨가구 및 비보호처리구보다 유의하게 높았고, 그 대비효과는 1.8내지 3배까지 증가하여, 보호처리 효과가 장내 흡수를 통한 림프를 거쳐 혈액으로 이행하는데 도움을 준 것으로 보인다.

- 하지만, 혈중 레티놀농도는 비타민A를 추가 보호처리하여 급여하였음에도 불구하고 다른 처리구보다 유의하게 낮았다. 아마도, 베타카로틴의 흡수량 증가는 반대로 비타민 A와의 경쟁으

로 비타민A의 흡수를 방해할 수 있는 것으로 생각된다.

- 또한, 베타카로틴대비 레티놀비율은 베타카로틴 흡수량이 낮을수록 전환효율이 큰 것으로 나타났고, 보호처리구는 공히 4.57내지 4.94 : 1의 비율로 무급여구 및 비보호구에 비하여 높은 수준의 전환율을 보여주었다.

Table 2. Plasma β -carotene and retinol concentrations of cows fed diets supplemented with protected or unprotected BC and/or vitamin A

Items	Treatments				SEM	<P
	Control	Unprotected BC	Protected BC	Protected BC+Vitamin A		
β -carotene, $\mu\text{g/dL}$	42.74 ^c	74.10 ^b	131.96^a	133.44^a	3.2665	<0.0001
β -carotene, μmol^*	0.80 ^c	1.38 ^b	2.46 ^a	2.48 ^a	0.0608	<0.0001
Retinol, $\mu\text{g/dL}$	30.89 ^a	29.30 ^{ab}	30.56 ^a	27.50^b	0.5030	<0.0001
Retinol, μmol^{**}	1.08 ^a	1.02 ^{ab}	1.07 ^a	0.96^b	0.0176	<0.0001
β -carotene:Retinol	1.47 ^c	2.70 ^b	4.57 ^a	4.94 ^a	0.1547	<0.0001

* One mole of retinol equals 286 grams of retinol.

**One mole of β -carotene equals 537 grams of β -carotene.

^{a,b,c}Means with the same superscripts are not significantly different at a level of P<0.05.

2. 혈중 대사물질

Table 3. Plasma metabolites concentrations of cows fed diets supplemented with protected BC with/without vitamin A

Items	Treatments				SEM	<P
	Control	Unprotected BC	Protected BC	Protected BC+Vitamin A		
Total protein, g/dL	7.13	7.04	7.05	7.12	0.0930	0.8501
Glucose, mg/dL	66.44	67.19	67.36	67.67	0.8204	0.7524
Creatinine, mg/dL	1.38	1.36	1.39	1.35	0.0192	0.5574
Urea nitrogen, mg/dL	12.06	11.33	11.89	11.78	0.2243	0.1345
Triglyceride, mg/dL	31.65 ^{ab}	30.22 ^b	32.83 ^{ab}	34.56 ^a	1.0440	0.0293
Non-esterified fatty acid, μmol	147.69	140.61	131.75	142.27	5.8510	0.2641
Total cholesterol, mg/dL	165.31	158.08	164.56	164.14	2.4859	0.1533
HDL cholesterol, mg/dL	154.47	148.94	151.25	150.72	2.1410	0.3290
LDL cholesterol, mg/dL	31.03 ^a	28.89 ^b	30.94 ^a	28.94 ^b	0.5542	0.0043

^{a,b}Means with the same superscripts are not significantly different at a level of P<0.05.

- 혈중 대사물질은 중성지방과 LDL-콜레스테롤을 제외한 다른 대사물질은 처리구간에 유의한 차이가 나타나지 않았다. 하지만, 중성지방농도는 보호 BC+비타민A 복합구가 가장 높았고, 비보호 BC구가 가장 낮았다.
- 반면 LDL-콜레스테롤농도는 비급여구에서 가장 높았고, 비보호 및 보호 복합구는 각각 28.89 및 28.94 mg/dL로 다른 처리구보다 유의하게 낮았다.

○ 농가실증시험 I : 저수태우에 대한 보호베타카로틴 급여 및 수정란 이식 수태율 조사

본 연구진에 의해 개발된 보호 베타카로틴제제를 수정란이식농가를 대상으로 실제 급여를 통하여 수태율이 증가하는지 검증하기 위하여 실시하였다.

연구 수행 방법

1. 공시축 배치 및 사양관리

본 연구기관에서 시행하는 『우량한우 수정란이식지원사업』에 참여하는 경남 남해군 소재 ○○생축장의 저수태한우 186두를 선정하여 급여 실증시험을 수행하였다. 시판베타카로틴 급여구와 개발된 보호베타카로틴 급여우로 각 92두 및 94두로 나누어 수정란이식 전 60일부터 매일 200 g(0.2%함유, BC 400mg)씩 급여하기 시작하여 임신여부 확인 시(이식 후 60일)까지 급여하였다.

시험에 참여하는 한우 대리모는 배합사료와 조사료를 따로 아침저녁으로 2회 섭취하였고, 물은 자유로이 접근가능하였다. 주된 조사료원은 볏짚 및 켄터키블루그래스건초가 주종이었다. 이들의 베타카로틴함량은 각각 kg당 0.05mg 및 0.21mg이었다.

2. 대리모의 발정동기화 및 수정란이식 시술, 임신감정

대리모의 수정란이식 시술은 인위적으로 발정동기화 프로그램(Gn-RH(0일) → PGF2α(7일) → Gn-RH(9일))을 적용하였고, 발정이 확인된 개체에 대하여 이식 전(발정확인후 7일) 난소내 황체상태를 확인한 후 신선수정란을 이식하였다. 임신감정은 이식 후, 60일 전후로 직장촉지 및 육안상 재발정 여부로 임신여부를 확인하였다.

3. 채혈, 베타카로틴 분석

□ 채혈

- 모든 공시축의 혈액(10ml)을 채취하였으며, 혈액은 경정맥을 통하여 채취하였다.
- 채취된 혈액은 빛과 온도에 의한 베타카로틴의 파괴를 막기 위하여 즉시 알루미늄호일(aluminum foil)로 튜브를 감싼 후 얼음박스에 넣어 실험실로 운반하였다.
- 운반된 혈액샘플은 외부 빛이 완전 차단된 실험실에서 원심분리기를 이용하여 3,000에서 10분 동안 원심분리 후 상층액 2ml를 튜브에 저장한 후, 즉시 -80℃ 저온냉장고에 분석시까지 보관하였다.

□ 베타카로틴 분석

- 베타카로틴은 Ethanol을 이용하여 serum 속의 protein을 제거한 후 혈장내의 β -carotene을 hexane으로 추출하여 450nm에서 UV/VIS spectroscopy(Libra, Biochrom, UK)를 이용하여 흡광도를 읽어 분석하였다.

4. 통계분석

- 모든 자료는 SAS(SAS Institute, 2011)의 Freq procedure를 이용하여 분석하였다.
 - 평균값은 LSMEANS procedure를 이용하여 산출하였다. 유의성은 P값 0.05이하일 때 유의성이 인정되고, 경향은 0.10이하로 인정하였다.

연구 수행 결과

- 본 연구진에 의해 개발된 보호베타카로틴제제를 농가에 실제 급여해본 결과, 수태율은 비보호제제를 섭취한 수란우 군보다 8%정도 증가하였고, 상대적 대비효과는 139%향상된 결과를 나타내었다. 하지만, 통계적인 유의성은 나타나지 않았다.
 - 또한, 혈중 베타카로틴농도는 비보호제품보다 2배이상 증가하여 82 μ g/dl를 나타내었다. 연구소에서 실시할 때보다 약 50 μ g/dl정도 낮게 나타났는데, 이는 급여 기초사료에서 기인하는 베타카로틴함량과 수정란이식시기가 6월~8월 사이의 고온의 하절기로 베타카로틴의 체내 소모량 증가로 낮아진 것으로 생각된다.

Table 4. Effects of feeding protected β -carotene (BC) supplements on pregnancy rates and plasma BC concentrations in recipient Hanwoo cows after embryo transfer

			Treatments		< P
			Unprotected BC (n = 92)	Protected BC (n = 94)	
No. cows with pregnancy			19 / 92	27 / 94	0.2021
Pregnancy rate, %			20.65	28.72 (139% increase)	-
Plasma BC, μ g/dl			38.07	82.43	<0.0001

3절. 3차년도 세부연구수행 결과

1. <1세부(경상대학교) : OPU유래 수정란의 질적 수준 분석 및 이식 적용기술 확립>

○ 무혈청배지 유래 수정란 생산기술 확립

본 연구의 목적은 수정란 생산 및 이식에서 혈청이 첨가되지 않은 culture media의 사용으로 생산된 수정란의 현장적용을 위한 가능성 확인에 있다. 또한 이러한 생산방식이 현장적용에 얼마나 적합한지 평가하는데 있다. 수정란 이식에서 blastocyst의 질은 우수한 후대를 생산하기 위한 중요한 요소이며, 수정란의 착상과 수태율을 높이는데도 매우 중요하다. 특히 culture media에 serum에는 밝혀지지 않은 요소들, embryotrophic 과 embryotoxic 등의 억제제가 포함되어 있으며 이러한 요소들로 인하여 수태율의 향상을 보일 수 있다. 그러나 지질의 metabolism에 대한 serum의 부정적인 영향은 3가지 메카니즘으로 정리해 볼 수 있다. 1) Serum 속의 lipoproteins이 세포에 internalized 해버리거나, 세포 내의 지질 함량을 증가시킨다. 2) Serum의 존재가 미토콘드리아를 대체할 수 있고, 그럼으로 인해 지질의 β -oxidation이 세포내 지질 축적을 증가시킨다. 3) Serum은 embryo의 triglyceride의 새로운 합성을 증가시킬 수 있다.

이러한 문제들을 해결하기 위하여 2차년도에 적용된 SOF-ITS무혈청 배양시스템을 이용하여 OPU유래 수정란 생산 및 이식을 실시하였다. 선발된 공란우는 3대 이상의 혈통등록이 된 개체를 1차 선발하여 후대검정 및 형매의 도체 성적이 A1++ 등급을 획득한 경험이 있는 암소를 우선 선발하였다. 2차 선발에서는 외모심사 및 초음파진단을 통하여 육질이 우수하며 BCS (Body Condition Score), 질병검사의 이상 유무를 확인하여 최종 9두를 선발하였다. 수정란 생산에 따른 혈청과 무혈청의 차이를 확인하기 위하여 혈청이 포함 및 무혈청 그룹으로 구분하였다. OPU 채란은 주 2회 실시하였으며 회수된 난자는 세포의 균질성, 형태 등을 판단하여 4가지 등급으로 분포하였다. 분류된 난자를 기준으로 수정란 생산에 공시하였으며 공란우에서 생성된 난포 및 난자 회수 및 난자의 등급은 다음과 같다 (Table 1). 사용된 공란우는 총 9두로 상반기 5두를 Group 1, 하반기 4두를 Group 2로 사용하였다. 회수된 총 난자는 Group 1이 2479개, Group 2가 1395개 였으며 각 그룹간의 회당 난자 회수율은 Group 1이 높았다 (65.9% vs. 62.5%; $P < 0.05$). 일반적으로 수정란 이식에 사용되는 1,2등급의 수정란 생산 개수 및 생산 효율은 두 그룹간의 유의적인 차이가 없었다 (24.6% vs. 29.9; $P > 0.05$).

Table 1. Effects of individual donors on the efficiency of oocytes collected by OPU sessions

Treatment	No. follicles aspirated	No. oocytes aspirated (%)					
		Total	Sum of Grades 1+2†	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4
Group 1	2479	1634	402	143	259	1114	117
		(65.9) ^a	(24.6)	(8.8)	(15.9)	(68.2) ^a	(7.2) ^a
Group 2	1395	1395	260	98	162	561	50
		(62.5) ^b	(29.9)	(11.2)	(18.6)	(64.4) ^b	(5.8) ^b

^{a-c} Within a column, means without a common superscript differed ($P < 0.05$).

배반포 발달율과 수정란 생산효율은 다음과 같다 (Table 2). Serum이 첨가된 CR1aa 베이스 배양액을 혈청 그룹으로 혈청이 첨가되지 않는 SOF 베이스 배양액을 무혈청 그룹으로 표기하였다. 수정란의 배반포 발달율은 혈청 그룹의 무혈청 그룹보다 유의적으로 낮은 것을 확인할 수 있었다 (35.7% vs. 46.1%; $P < 0.05$).

Table 2. Effects of individual donors on the efficiency of *in vitro* embryo production by OPU sessions

Treatment s	No. of oocytes collected by G1-G3	No. cleaved embryos (%)	No. of blastocyst developed (%)
Serum	1516	953 (62.8) ^a	541 (35.7) ^a
Free-serum	821	541 (65.8) ^b	378 (46.1) ^b

^{a-c} Within a column, means without a common superscript differed ($P < 0.05$).

무혈청 그룹과 혈청 그룹 간에 생산된 수정란은 공란우를 제공한 지역에 이식을 실시하였으며, 준비된 수란우는 이식 전날 황체확인을 통하여 이식여부를 판단한 후 수정란 이식을 실시하였다. 임신감정은 수정란 이식 후 2~3개월이 지난 시점에 감정을 실시하였으며 결과는 다음과 같다 (Table 3). 수정란 이식은 혈청 그룹이 246마리의 수란우에 무혈청 그룹은 83두의 수란우에 실시하였으며, 수태율은 혈청 그룹에서 135두, 무혈청 그룹에서 47두의 임신감정 결과로서 그룹간의 임신율은 유의적으로 차이가 없었다 (54.7% vs. 56.4%; $P < 0.05$).

Table 3. Effects of serum addition in the IVC media on the pregnancy after transfer of OPU derived embryos

Treatments	No. embryo transfer	No. pregnancy	Pregnancy rate (%)
Serum	246	135	54.7
No serum	83	47	56.4
Total	329	181	55.1

이러한 연구결과를 보면 분할율 무혈청이 낮지만 배반포 발달율은 혈청과 유의적인 차이가 없었다. 수정란 이식 후 수태율에서도 서로간의 차이가 미비하였으므로 이러한 결과는 무혈청 배양액이 혈청 배양액을 충분히 대체할 수 있을 것으로 판단되며 결론적으로 소의 체외 수정란 생산에서 무혈청은 거대 태아로 인한 난산 및 유산 등의 예방을 위하여 적용될 수 있을 것으로 판단된다. 이상의 결과를 통하여 수정란 이식의 수태율을 확인 해 본 결과 현장 적용 및 상업적 이용에도 문제가 없을 것으로 생각된다.

○ 수정란 장기저장기술 유래 수정란이식 현장적용기술 확립

수정란의 산업화를 위해서는 우선 동결기술을 이용하여 수정란 공급이 시간적 공간적 한계를 극복 할 수 있으나 현재의 기술 수준에서는 신선란 보다 수태율이 낮은 것이 현실이다. 이를 극복하고자 본 연구실에서는 수정란의 활용성을 높이기 위하여 저온저장(5°C 이하) 수정란을 통한 장기저장기술을 2차년도에 개발 하였으며, 2개 지역을 대상으로 이식을 실시하였으나 3차년도에는 8개 지역에 이식을 실시하여 현장에 적용하여 수태율 확인을 통해 저온저장 기술의 효율성을 확인하였다. 저온 수송은 5°C 이하에서 수송을 실시하였으며 일반적인 수정란 이식은 35°C에서 진행하였다. 저온 수정란 공급 시 주의해야 할 점은 절대 5°C 이상 저장온도가 상승하지 않는 조건으로 저장을 해야 한다.

Table 4. Pregnancy rate of OPU derived embryo transfer depend on transportation temperature

Temperature (°C) *	Embryo Transfer	Pregnancy (%)
High (Approx. 35°C)	511	265 (51.9)
Low (Under 5°C)	633	310 (49.0)
Total	1144	575 (50.3)

* 수송온도는 보온상태 (약 35°C)와 저온상태 (약 5°C 이하)로 수송하였음.

위의 결과에서 나타나듯 일반적인 보온수송과 저온수송 간의 수태율은 유의적인 차이는 없었다. 특히 현장에서 기존의 보온수송은 운송시간과 이식시간을 고려하여 단시간 내에 이식을 실시해야 하기에 자연발정우에 이식에 많은 어려움이 있었다. 그러나 저온수송은 최대 3일까지

의 수정란이 대부분 생존 할 수 있기 때문에 자연발정우의 경우에도 이식을 실시 할 수 있는 장점이 있다. OPU 유래 수정란의 경우 주 2회 채란하기 때문에 주 2~4회 공급을 할 수 있었으나 저온수송을 이용하면 주 6회까지 이식이 가능하므로 발정동기화를 통한 이식을 하지 않더라도 언제든지 이식을 실시 할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 2차년도에는 제한적으로 실시 하였다면 3차년도에는 대량의 이식을 통하여 수정란 이식 산업화에 효율성을 높일 수 있을 것으로 판단된다.

○ 동결수정란 생산효율 개선 및 수정란 이식기술의 개선에 의한 수태율 향상

수정란 이식의 진정한 산업화를 위해서는 동결기술이 확보 되어야 한다. 현재까지 수정란 이식기술은 생산일정에 따른 제약이 있으며 이러한 제약으로 인하여 최대 주 4회의 이식이 가능하나 시간과 공간에 제약이 따른다. 이러한 제약은 발정동기화를 맞추기 위해 호르몬 처리를 통하여 극복하여 왔으나 한계점이 분명하며 호르몬 처리 비용과 공태기간 증가에 따라 농가에 많은 부담이 되고 있으며 수정란이식의 대중화에 발목을 잡고 있다. 수정란의 동결기술은 이러한 단점들을 극복할 수 있으며 동결수정란의 활용은 시간과 공간의 제약을 극복 할 수 있다. 그러나 현재까지의 기술수준에서는 동결정액의 인공수정과 같은 기술까지 구현하는데 많은 어려움이 있다. 이러한 방법을 극복하고자 본 연구실에서는 수정란의 발달단계에 따라 수정란의 동결 용해 후의 생존율을 비교하였으며 배양환경은 기존의 CO₂에 질소가 포함된 혼합가스를 사용하였다 (Fig. 1).

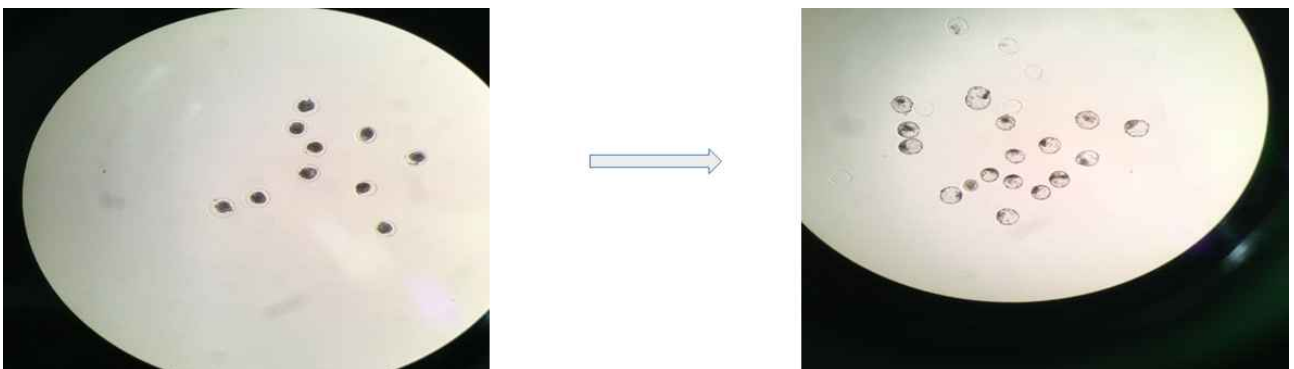


Fig. 1. 용해 직후 수정란과 24시간 후 수정란의 형태.

Table 5. Effect of embryo stage on the survival and hatching competence of post-thaw embryos

Embryo stage	No. (%) of embryos		
	Thawed	Survived	Hatched
Early BL	10	8 (80.0)	4 (40.0)
BL	10	9 (90.0)	4 (40.0)
Exp. BL	16	16 (100)	13 (81.2)

위의 결과를 확인한 결과 Exp BL의 stage에서 동결하였을 때 생존율 및 부화율이 높은 것으로 확인되었으며 기존의 방법으로 동결 용해를 비교한 결과는 다음과 같다. 즉 생존율도 중요하지만 더욱더 중요한 요인은 용해 후 부화율이다. 즉 투명대를 탈출한 수정란이 착상을 시도할 수 있기 때문에 부화율은 임신율을 개선하는데 결정적인 역할을 할 수 있을 것이다. 그리하여 Exp. BL에서 동결 및 용해가 생존율과 부화율에서 훨씬 효과적이라는 것이 확인되었다 (Fig. 2).

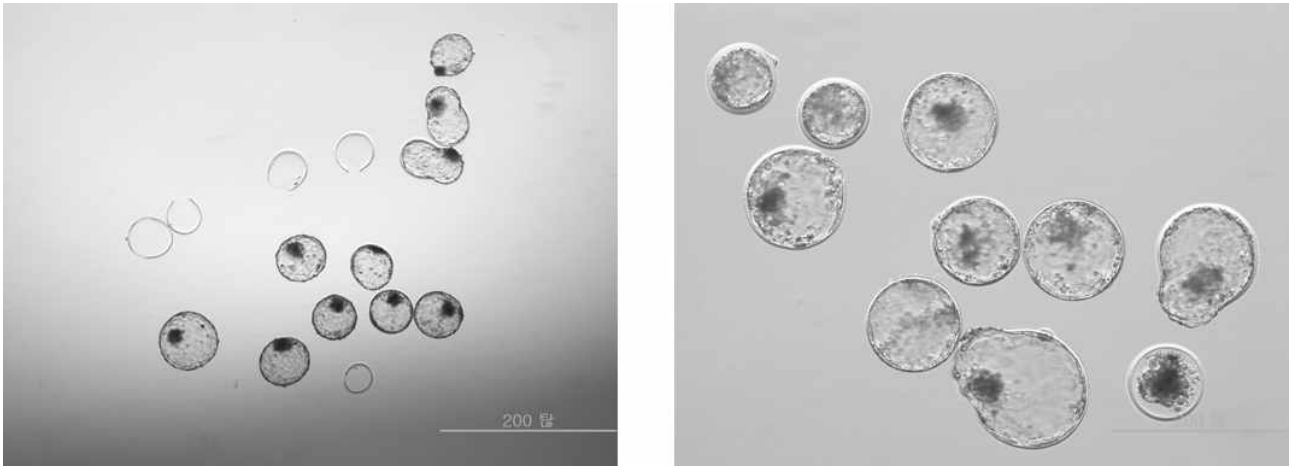


Fig. 2. Morphology of post-thaw blastocysts at 24 hrs (left) and 48 hrs (right).

Table 6. Effect of BL stage on the survival and hatching rate

Embryo stage	No. (%) of embryos		
	Thawed	Survived	Hatched
exp BL	45	44 (97.7)	33 (73.3)
Early & middle BL	155	131 (84.5)	76 (58.0)

이상의 결과를 종합해 볼 때 기존의 동결수정란의 동결/용해 후 생존율보다 높은 결과와 함께 부화율이 매우 높다는 것은 동결수정란을 현장이식에 적용할 수 있을 것으로 판단된다 (Table 6). 이러한 기반에서 동결수정란 및 신선란을 현장에 적용하였을 때의 결과는 다음과 같으며 동결란은 용해 후 신선란의 공급과 같은 방법으로 이식을 실시하였다. 신선란은 3511개를 이식하였으며 1825두에서 임신이 확인되어 52.0%의 결과를 보였으며 동결란은 146개를 이식하여 65(45.0%)두에서 임신이 확인되었다 (Table 7).

Table 7. Comparison of pregnancy rate between frozen and fresh embryo transfer

Treatment	Embryo Transfer	Pregnancy (%)
Fresh embryo	511	265 (51.9)
Frozen embryo	146	65 (45.0)

이와 같은 결과에서 신선란 대비 동결수정란의 수태율이 약간 낮은 것을 확인할 수 있었으나, 본 연구의 최종 목표인 50%에 근접하는 것으로 확인되었다. 다만, 현재의 동결기술을 개선한다면 동결수정란의 수태율을 목표치까지 높일 수 있을 것으로 판단된다. 수정란 이식에서 동결기술의 개발 및 확립은 산업화의 궁극적인 목표이며 지속적인 보완연구를 통하여 개선된다면 신선란과 같은 수준의 수태율을 얻을 수 있을 것이며, 동결정액을 이용한 인공수정과 같이 동결수정란을 이용한 수정란이식기술이 현장에서 적용될 수 있을 것이다.

<2세부(경상대학교) 난포파동주기 유래 OPU 수정란생산의 현장적용기술 확립>

○ 난포파동주기 유래 수정란 생산효율 향상기술 확립

난포의 파동주기에 따른 수정란 생산효율을 조사하기 위하여 2회 난포파동 공란우 그룹(4두)과 3회 난포파동 공란우 그룹(4두)의 수정란 생산효율 조사하였다. 2차년도 연구에서 난포 파동의 확인을 위하여 3주간의 조사가 필요하였기 때문에 이를 개선하고자 사전에 파동주기를 조사하였으며 2 또는 3회 난포파동이 확인 된 공란우는 충분한 휴식기간을 가진 후 약 3개월 간 생산하였다. 생산된 난자의 등급 결과는 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Oocytes grade from 2 and 3 follicular wave donors

OPU session	Follicle # (Mean)	Oocyte # (Mean)	Grade of oocyte recovered			
			Grade 1 (% , Mean)	Grade 2 (% , Mean)	Grade 3 (% , Mean)	Grade 4 (% , Mean)
3 follicular wave*	2320 (41.4)	1109 (21.3)	90 (7.6, 1.6)	226 (19.0, 4.0)	806 (57.6, 14.4)	68 (4.9, 1.2)
2 follicular wave*	1108 (46.2)	536 (22.3)	40 (7.5, 1.7)	66 (12.3, 2.8)	390 (72.8, 16.3)	40 (7.5, 1.7)

* Donor number is 4 Hanwoo

회수된 총 난자 수는 3회 난포파동 그룹이 1109개, 2회 난포파동 그룹이 536개 확인 되었으면 회당 각각 85.0, 89.3개의 난자가 회수되었다. 3회 난포파동 그룹과 2회 난포파동 그룹의 1등급 난자는 각각 90개(7.6%), 40개(7.5%)로 확인되었으며, 2등급은 각각 226개(19.0%), 66개(12.3%), 3등급은 806개(57.6%), 390(72.8%), 4등급은 68개(4.9%), 40개(7.5%)로 확인되었다. 1등급의 경우 각 그룹간의 차이가 없었으며 2등급을 제외한 3등급과 4등급의 경우 2회 난포파동그룹이 높은 것을 확인하였다.

난포파동에 따른 공란우의 수정란 생산효율은 다음과 같다(Table 2). 공시된 난자는 3회 난포파동 그룹 1109개, 2회 난포파동 그룹 536개였으며, 생산된 수정란은 각각 1398개, 146개로 확인되었다. 공란우는 체란 횡수별 평균 7.1개 및 6.1개로 확인되었다.

Table 2. Blastocyst production efficiency of 2 and 3 follicular wave derived oocytes

Follicular wave	Oocytes # (Mean)	Cleavage # (% , Mean)	Blastocyst # (% , Mean)
3 follicular wave*	1109 (21.3)	770 (64.7, 13.8)	1398 (33.4, 7.1)
2 follicular wave*	536 (22.3)	392 (73.1, 16.3)	146 (27.2, 6.1)

난포파동주기에 따라 생산된 수정란을 활용하여 현장에 이식을 하여야 하나 연구에 사용된 공란우의 능력 및 정액의 능력이 농가에 이식할 수준의 능력이 되지 않아 이식한 결과를 확인하지는 못하였다. 즉 난포파동을 이용한 GVII난자의 생산 및 이를 이용한 이식 가능한 수정란의 생산 가능성과 효율을 검증하는 연구까지 성공적으로 수행하였다.

○ OPU 수정란이식 현장 적용기술 확립

본 연구실에서 2차년도에 이어 OPU 유래 수정란 이식사업도 진행하고 있으며 우수한 형질의 공란우 5두를 선별하여 사용하였다. OPU 채란은 첫 입식 후 대난포 작업을 1회 실시한 후 주 2회 실시(Table 3)하였다. 즉 실제 현장에 이식은 기존의 OPU유래 수정란의 생산으로 이식을 실시하였으며 그에 따른 이식결과는 다음과 같다.

Table 3. OPU derived oocyte recovery rate by conventional OPU session system*

OPU session	Follicle # (Mean)	Oocyte # (Mean)	Grade of oocyte recovered			
			Grade 1 (% , Mean)	Grade 2 (% , Mean)	Grade 3 (% , Mean)	Grade 4 (% , Mean)
109	4932 (45.2)	2678 (24.5)	198 (7.4, 1.81)	616 (23.0 5.56)	1494 (55.8, 13.7)	370 (13.8, 3.39)

* H 군의 데이터를 정리한 것임.

채란된 수정란은 연구실로 수송하여 수정란 생산에 사용 하였으며 생산된 수정란은 상태에 따라 3등급으로 분류하여 A등급의 수정란만 선별하여 이식에 사용하였다. 수정란 이식 사업은 2019년 5월부터 11월까지 진행되었으며 결과는 다음과 같다(Table 4).

Table 4. Summary of OPU embryo production and embryo transfer*

OPU session	Oocytes # (Mean)	Cleavage # (% , Mean)	Blastocyst # (% , Mean)	ET #
109	2678 (24.5)	1651 (61.7, 21.2)	836 (31.2, 7.66)	583

* H 군의 데이터를 정리한 것임.

수정란 이식을 통한 수태율에 대한 결과는 다음과 같다. 2차년도에 발표하지 못한 수태율과 3차년도에 이식 후 수태율을 확인해 보면 2차년도에는 51.3%, 3차년도에는 48.0%로 확인 되었으며 3차년도에 수태율이 소폭 감소한 이유는 2차년도에 이식에 참여한 농가 수의 차이에 기인하는 것으로 생각된다. 수정란 이식을 통한 개량의 관심도가 높아짐에 따라 참여농가의 수가 늘었으며, 농가에 따른 사양관리의 차이 및 대리모 관리에 따른 것으로 생각된다. 즉 현장에서 수태율의 향상은 농가에서 사육하고 있는 대리모의 상태가 가장 큰 영향을 미치고

있으나, 실제 이를 관리할 수 있는 상황이 쉽지 않다. 그리하여 실제 이식 후 수태율은 수정란의 질적 수준이 크게 영향을 미치지 못하고 대리모의 건강, BCS 등에 의해 크게 좌우되는 경향이 높다.

Table 5. Pregnancy rate of OPU embryo transfer

Year	No. embryo transfer	No. pregnancy	Pregnancy rate (%)
2018	413	212	51.3
2019	583	280	48.0
Total	996	492	49.3

이상의 결과를 종합해 보면 기존에 본 연구실에서 주 2회 채란하여 수정란을 공급하는 것이 follicle wave를 확인하여 생산 및 이식하는 방법에 비하여 산업화에 적용이 쉬운 것을 확인하였다. Follicle wave를 적용하면 회당 수정란 생산율은 높일 수 있으나 GVII 단계를 분석하는데 많은 시일(2~3주 이상)이 소요되며 현장에서 실질적으로 공란우를 사용 할 수 있는 기간이 줄어들기 때문인 것으로 생각된다. OPU 수정란 생산에 사용되는 공란우는 채란 시작 후 4개월부터 수정란 생산율이 낮아지기 때문에 연구적인 성과로서는 회당 생산율을 높이는 장점이 존재하나 대리모의 대기시간이 길어지는 단점이 있기 때문이다.

<1협동(경상남도 축산연구소) : 수태율 향상을 위한 대리모의 사양관리 및 선발기준 확립>

○ 베타카로틴 적정급여수준 결정 사양시험

- 베타카로틴은 비타민 A전구물질로서, 베타카로틴 1 mg은 비타민 A 400 IU의 활성을 가진다. 이는 시각, 성장, 번식 및 상피조직의 유지에 필수적이며, 특히, 번식과 관련하여 난소의 황체에 많이 존재할 때 수태율이 향상되는 것으로 알려져 있음(Hurley and Doane, 1989).
- 하지만, 대리모(번식우)에서 베타카로틴의 요구량과 반추위내 안정성이 거의 보고된 바 없거나, 명확하지 않아, 본 연구진의 1년차 연구에서 현행 시판되는 베타카로틴 첨가제(보조사료)의 효능을 검증해 본 결과, 무급여구와 비교하여 혈중 농도의 유의한 차이가 나타나지 않았으며, 비타민A로의 전환을 통한 혈중 retinol농도 증가현상도 나타나지 않음에 따라, 섭취하는 대부분의 베타카로틴 보조사료는 반추위에서 분해되던지, 또는 소장내 흡수가 이루어지지않고 대부분이 분변으로 배설되는 것으로 생각됨.
- 또한, 보조사료형태의 베타카로틴은 반추위내 보호되지 않은 상태에서 반추위 내 분해율이 약 50% 이상의 높은 수준으로 분해되는 것으로 보고되어(Nozière, 2006), 반추위 및 십이지장 이후 소장까지 안정적으로 이행할 수 있도록 하는 보호처리가 요구됨.
- 2년차결과에서 β -carotene농도가 보호처리구(protected BC 및 BC+Vitamin A)에서 각각 131.96 및 133.44 μ g/dl로 무첨가구 및 비보호처리구보다 유의하게 높게 나타남에 따라 베타카로틴 단독 보호처리효과가 최적인 것으로 나타났음.
- 따라서, 본 연구에서는 최적의 반추위 보호 베타카로틴제제(Protected-BC)를 수준별로 급여하여 한우 암소의 장내 흡수 및 혈중 대사물질을 조사하여 최적의 급여수준을 결정하고자 함(사양시험Ⅲ).

연구 수행 방법

1. 공시축 배치 및 사양관리

- 공시축으로 임신한우 12두(개시체중; 431.4 \pm 15.4kg)를 선정한 후, 처리구간 개시체중의 차이가 크지 않도록 총 4개의 우방(4 \times 8m)에 각 3두씩 배치하였고, 물은 자유롭게 섭취할 수 있게 하였다.
- 처리구는 본 연구진에 의해 개발된 반추위 보호 베타카로틴제제(대한민국 특허출원 제 10-2019-0085129)를 활용하여 1일 두당 200, 400, 600mg 급여구의 총 3개의 처리구로 배치하였으며, 한 pen(우방)당 3두의 임신우를 공시하여 동일한 우방 내에 있는 소는 같은 처리구의 사료를 섭취하도록 개체별로 관리하였으며, Change-over design으로 사양시험을 실시하였다. 각 period는 28일로 하였고, 총 3 period 12주간 사양시험을 실시하였다.
- 사양시험이 진행되는 동안, 사료는 1일 2회 아침, 저녁으로 나누어 급여하였고, 매일 급여량과 잔량을 기록하여 사료섭취량을 조사하였다. 그리고 영양소섭취량을 조사하기 위하여 매주 1회 급여사료를 채취하여 수분과 영양소함량을 분석하였다.
- 본 연구의 실험사료는 시판 섬유질배합사료(TMR)에 정해진 양의 베타카로틴제제 및 에너지제제를 활용하여 에너지와 단백질함량이 동일하도록 배합하였으며, 이들의 원료배합량 및 영양

소성분함량은 표 1과 2에 나타내었다.



Fig 1. Appearance of rumen undegradable β -carotene (Korea Patent pending No. 10-2019-0085129)

Table 1. Ingredients and chemical composition of each

Items	Ingredients		
	TMR ¹⁾	BC supplement ²⁾	Non BC supplement ³⁾
		% of dry matter	
Dry matter, %	59.06	99.87	97.40
Crude protein, %	13.13	4.72	4.68
ADF ⁴⁾ , %	25.40	-	-
NDF ⁵⁾ , %	47.15	-	-
Ether extract, %	6.42	86.19	87.43
Crude fiber, %	20.51	-	-
Crude ash, %	9.50	5.51	5.23
Beta-carotene, mg/kg	1.23	2,002.60	2.36
Vitamin A, IU/kg	5,822.25	-	-

¹⁾Commercial total mixed ration was purchased from Hapcheon Livestock Cooperatives feed mill, Gyeongnam province of S. Korea; ²⁾ β -carotene supplement that is double-coated with hydrogenated fat; ³⁾hydrogenated fat without β -carotene; ⁴⁾acid detergent fiber; ⁵⁾neutral detergent fiber

- 실험이 진행되는 동안, 베타카로틴 및 전장 영양소소화율을 측정하기 위하여 chromium sesquioxide (Cr₂O₃)를 지시물질로 사용하였고, 실험기간 전기간에 걸쳐서 1일 두당 5 g을 급여사료와 혼합하여 공급하였다.
- 각 period의 첫 17일간은 임신우를 실험사료에 적응시켰고, 18일부터 22일까지 연속 5일간 아침저녁으로 1일 2회씩 개체별로 직장축진을 통하여 신선한 분을 채취하였으며, 26, 27일 및 28일째 채혈을 각 1회씩 총3회에 걸쳐 실시하였고, 채취된 혈액은 아이스박스에 넣어 실험실로 운반하였고, 빛이 차단된 환경에서 혈장을 분리하였다.

Table 2. Feed intake (g/d) and chemical composition of experimental diets

Items	Treatments, mg of β -carotene/d		
	200	400	600
Feed intake (g/d)		as-fed	
Commercial total mixed ration ¹⁾	9,000	9,000	9,000
BC supplement ²⁾	100	200	300
Non-BC supplement ³⁾	200	100	-
		% of dry matter	
Dry matter, %	60.33	60.37	60.40
Organic matter, %	90.68	90.66	90.66
Crude protein, %	12.67	12.67	12.67
ADF ⁴⁾ , %	24.04	24.02	24.01
NDF ⁵⁾ , %	44.65	44.62	44.60
Ether extract, %	10.65	10.66	10.67
Crude fiber, %	19.42	19.40	19.39
Non-fibrous carbohydrate, %	22.71	22.72	22.73
Crude ash, %	9.32	9.34	9.34
Calcium, %	1.68	1.68	1.68
Phosphorus, %	0.54	0.54	0.54
Beta-carotene, mg/kg	36.88	72.42	107.94
Vitamin A, IU/kg	5,619	5,619	5,619
TDN ⁶⁾ , %	73.03	73.04	73.05
DE ⁷⁾ , Mcal/kg of DM	3.22	3.22	3.22
ME ⁸⁾ , Mcal/kg of DM	2.64	2.64	2.64

¹⁾Commercial total mixed ration was purchased from Hapcheon Livestock Cooperatives feed mill; ²⁾ β -carotene supplement that is double-coated with hydrogenated fat; ³⁾hydrogenated fat without β -carotene; ⁴⁾acid detergent fiber; ⁵⁾neutral detergent fiber; ⁶⁾total digestible nutrients; ⁷⁾digestible energy; ⁸⁾metabolisable energy; DE and ME values were calculated as described in Korean Feeding Standard for Hanwoo (2007).

- Cr₂O₃를 이용한 분으로 배설되는 양의 추정은 다음의 식을 활용하여 계산되었다(Bondi, 1987).

- 분 건물량 (g/일) = [사료중 Cr₂O₃(mg/건물 g) × 건물섭취량]/[분중 Cr₂O₃(mg/건물 g)]

- 영양소소화율은 배설되는 분양에 분영양소비를 곱하여 배설 영양소함량을 결정하고, 섭취 영양소함량대비 흡수되는 영양소함량의 비율로 나타내었다.

2. 채혈, 비타민 A, 베타카로틴 및 혈액성분 분석

□ 채혈

- 모든 공시축의 혈액(10ml)을 채취하였으며, 혈액은 경정맥을 통하여 채취하였다.

- 채취된 혈액은 빛과 온도에 의한 베타카로틴 및 비타민 A의 파괴를 막기 위하여 즉시 알루미늄호일(aluminum foil)로 튜브를 감싼 후 얼음박스에 넣어 실험실로 운반하였다.

- 운반된 혈액샘플은 외부 빛이 완전 차단된 실험실에서 원심분리기를 이용하여 3,000×g에서 10분 동안 원심분리 후 상층액 2ml를 튜브에 저장한 후, 즉시 -80℃ 저온냉장고에 분석 시까지 보관하였다.

□ 비타민 A 분석

- 비타민 A는 혈중 retinol을 분석하였으며, HPLC(Perkinelmer, Series 200, USA)를 이용하여 분석하였으며, 분석방법을 요약하면 다음과 같다.

- 혈청 200 μ l, internal standard 20 μ l 및 kit 용액 I 25 μ l을 갈색병에서 혼합시킨 후 400 μ l의 kit 용액 II를 혼합하여 9,000 \times g에서 10분간 원심분리 후 상층액 50 μ l를 HPLC에 주입하여 분석하였다.

□ 혈중 베타카로틴 분석

- 혈중 베타카로틴은 Schweigert 등 (2007)의 방법에 따라 one-step denaturation 및 유기용매 추출 후, iEXTM assay system에 의하여 소 혈액 전용 carotene photometer (iCheckTM; BioAnalyt GmbH, Germany)를 이용하여 분석하였다.

□ 사료 및 분중 베타카로틴 분석

- 시료 1g을 50 ml 삼각플라스크에 취해 6.25% NH₄OH 용액 5 ml와 protease(Sigma, P-4032) 12.5 mg을 첨가하고 55 $^{\circ}$ C 항온수조에서 1시간가량 놓아둔 뒤 실온 암소에서 1시간 방치하였다. 방냉 후 에틸알콜 10 ml와 Cyclohexane 25 ml를 정확히 넣고 30분간 shaking후 방치하여 층을 분리시킨 다음 상층액을 취하고 syringe filter(0.45 μ m)로 여과한 것을 분석용 시료로 하였으며, Table 3과 같은 조건으로 HPLC로 분석하였다.

- 표준용액은 β -carotene(Sigma C9750) 표준물질을 사용하였고 최종 100~300 mg/kg 농도가 되도록 cyclohexane에 녹여 준비하였다.

□ 혈액 지질대사물질 분석

- 혈장 내 지질성분인 triglyceride, total cholesterol, HDL 및 LDL-cholesterol 및 non-esterified fatty acid농도는 자동혈액분석기를 이용하여 분석하였다.

Table 3. Analytical conditions of HPLC for the determination of β -carotene

Items	Conditions
Instrument	Waters Isocratic(510 pump, 486 UV/VIS detector)
Column	Alltima Silica(4.6x250 mm)
Mobile phase	Cyclohexane : Ethylacetate = 8 : 2
Detector	UV450 nm
Flow rate	1.0 ml/min
Column temp.	30
Injection volume	20 μ l

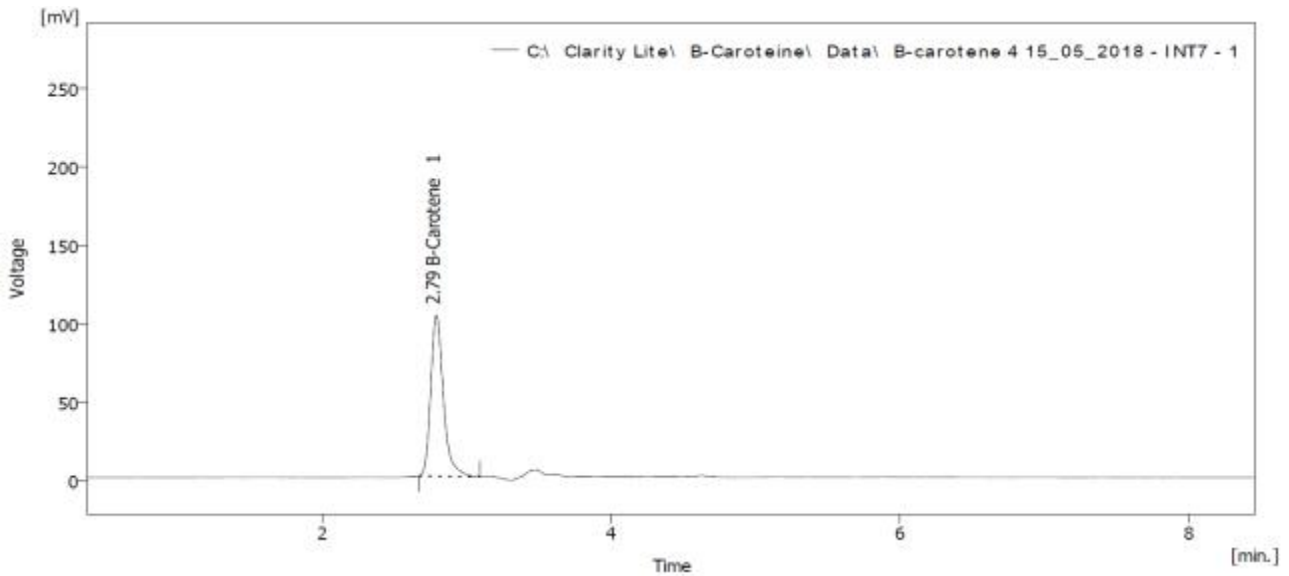


Fig 2. Beta carotene chromatogram for sample

3. 통계분석

- 1, 2차년도와 동일한 방법으로 분석을 진행하였다.

연구 수행 결과

1. 혈중 β -carotene 및 비타민 A 농도

- 표에서 보는 바와 같이 β -carotene농도는 베타카로틴 급여수준이 증가함에 따라 400mg 이상 급여구가 200 mg 급여구보다 유의하게 높았고($P < 0.001$), 전 처리구에서 1.5 mg/L이상으로 높게 나타나 반추위 비분해 베타카로틴이 양호한 장내 흡수상태를 나타내었다. 베타카로틴의 정상수준은 3내지 12 mg/L, 준정상수준은 1 - 2 mg/L 및 결핍수준은 1 mg/L이하로 보고되고 있다(Can 등, 1986; Puls, 1994). 하지만, 최근 연구에서는 1.5 mg/L이상은 되어야 만족하는 것으로 보고된다(Immig, 2009).

- 그림에서 나타난 바와 같이, 사료를 통한 베타카로틴 섭취수준을 달리하였을 때, 혈중 베타카로틴농도를 적용하여 그림으로 나타낸 것이며, 이를 통해 단순직선회귀식은 그림과 같이 산출되었고, 혈중 1.5 mg/L이상의 베타카로틴을 유지하기 위해서 필요한 베타카로틴 두당 최소 섭취량은 130mg [제품기준 : 65 g]인 것으로 추정되었다. 산출된 회귀식은 50%($R^2=0.4987$)의 설명력을 갖추는 것으로 조사되었다.

- 하지만, 혈중 레티놀농도는 베타카로틴 급여수준이 증가하여도 혈중 농도에 영향을 받지 않았고, 실질적으로 베타카로틴이 비타민 A의 전구물질이어도 사료로 섭취되는 비타민 A가 부족되지 않는 한, 베타카로틴이 비타민 A로 전환되지 않고, 체내에 저장시키는 것으로 생각된다. 베타카로틴은 간조직과 지방조직에 주로 저장되고, 생식기의 난소나 자궁에 고농도로 유지하고 있어 비타민A와는 별개로 암컷 가축의 발정, 임신유지 및 유사산감소에 관여한다(Schweigert 등, 1986; Haliloglu 등, 2002; Schweigert, 2003).

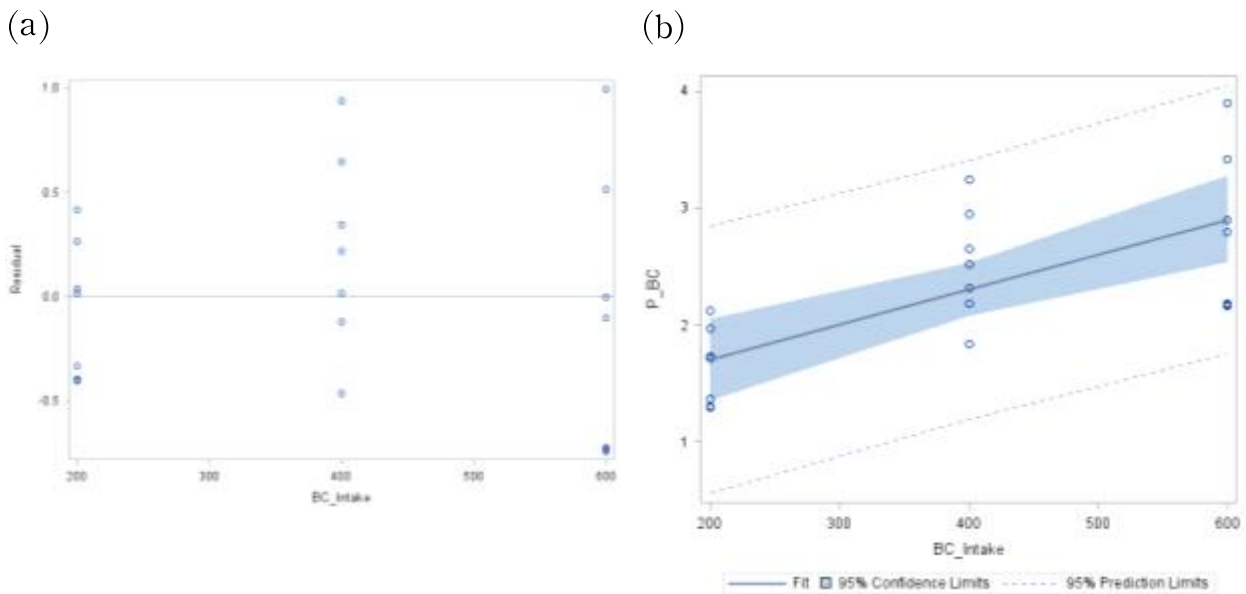


Fig 3. Residual (a) and fit plot (b) for plasma beta-carotene (mg/L) against varying levels of beta- carotene intake (mg/d).

Regression equation : $P_BC = 1.10237(\pm 0.285) + 0.003(\pm 0.00067)BC_Intake$ ($P < 0.0002$; $R^2 = 0.4987$; $MSE = 0.2707$); P_BC = plasma beta-carotene concentration (mg/L); BC_Intake = beta-carotene intake (mg/d).

2. 혈중 대사물질농도

- 아래 표에서 보는 바와 같이, 지방대사물질은 베타카로틴 섭취수준이 증가함에 따라 유의한 영향을 미치지 않았다. 베타카로틴은 소수성의 비극성물질로서 동물이 섭취 후 다양한 지방단백(lipoprotein)에 의해 각 조직으로 운반되고, 특히 지방대사에 상당히 관여하는 것으로 알려져 있다(Shete와 Quadro, 2013).
- Chew 등(1993)은 송아지 때 베타카로틴의 섭취는 LDL-콜레스테롤에 부착되어 높은 수준의 베타카로틴을 운반한다고 보고한 반면, Ashes 등(1984)은 베타카로틴의 혈중 운반체는 HDL-콜레스테롤이라고 보고하였다.
- 하지만, 본 연구에서 LDL콜레스테롤농도가 200 mg급여구보다 400 및 600mg급여구에서 다소 높은 농도를 나타내었고, 또한 총콜레스테롤대비 및 HDL-콜레스테롤대비 LDL콜레스테롤 비율이 다소 높은 지는 양상을 나타내어 베타카로틴의 흡수 및 운반에 LDL콜레스테롤이 더 관여하는 것으로 보인다. 이러한 결과는 Chew 등(1993)과 일치된 결과를 나타내었다.

Table 4. Plasma lipid metabolites as fed varying levels of β -carotene to gestating Hanwoo cows

Items	Treatments (mg of β -carotene/cow/d)			SEM	Contrasts, <P	
	200	400	600		L	Q
β -carotene, mg/L	1.54 ^b	2.52 ^a	2.92 ^a	0.1915	0.0004	0.2392
Retinol, mg/L	0.2452	0.2435	0.2577	0.0065	0.1890	0.3066
Triglyceride, mg/dL	39.62	41.13	40.15	2.1087	0.8641	0.6214
Total cholesterol, mg/dL	197.10	193.56	196.36	7.9741	0.9493	0.7396
HDL cholesterol, mg/dL	175.66	170.85	174.28	6.4344	0.8834	0.5932
LDL cholesterol, mg/dL	59.78	70.03	69.82	5.9478	0.2493	0.4630
Non-esterified fatty acid, μ mol	130.50	116.58	126.55	6.2002	0.6664	0.1131
HDL/total cholesterol	0.8958	0.8887	0.8905	0.0057	0.5304	0.5150
LDL/total cholesterol	0.2944	0.3461	0.3439	0.0212	0.1158	0.2941
LDL/HDL	0.3316	0.3959	0.3901	0.0249	0.1137	0.2462

^{a,b}Means with the same superscripts are not significantly different at a level of $P < 0.05$.

L : linear effect; Q : quadratic effect

3. 분중 베타카로틴 농도 및 전장 영양소 소화율

Table 5. Fecal beta-carotene concentration and whole tract digestibility of nutrients as fed varying levels of beta-carotene to gestating Hanwoo cows.

Items	Treatments (mg of β -carotene/cow/d)			SEM	Contrasts, <P	
	200	400	600		L	Q
Dry fecal β -carotene (μ g/g)	14.33 ^b	25.65 ^a	26.15 ^a	3.5503	0.0313	0.2139
Whole tract digestibility (%)						
Dry matter	42.02 ^b	44.67 ^{ab}	45.47 ^a	1.0095	0.0276	0.4497
Organic matter	47.72 ^b	50.09 ^a	50.67 ^a	0.7255	0.0104	0.3107
Crude protein	46.96 ^b	50.05 ^a	49.18 ^{ab}	0.7771	0.0614	0.0438
Ether extract	51.74 ^b	53.30 ^{ab}	56.18 ^a	1.6061	0.0101	0.6092
Beta-carotene	73.72 ^b	82.14 ^a	83.81 ^a	4.8829	<0.000 1	0.0192
Neutral detergent fiber	44.05 ^c	47.46 ^b	50.42 ^a	0.9693	0.0003	0.8354
Non-fibrous carbohydrate	52.73	53.18	53.94	3.1396	0.4568	0.9098

^{a,b,c}Means with the same superscripts are not significantly different at a level of $P < 0.05$.

- 분중 베타카로틴 농도는 베타카로틴 섭취수준이 증가함에 따라 유의하게 증가하였고($P < 0.05$,

직선효과), 400 및 600 mg 급여구는 200 mg 급여구보다 유의하게 높았으나($P < 0.05$), 400과 600 mg 급여구 간에 유의한 차이가 나타나지 않았다. 본 결과는 섭취수준 증가에 따른 배설 베타카로틴의 증가에 기인한 결과이며, Mora 등(2001)의 연구에 의하면, 사료 kg당 5.5, 44 및 352 mg의 베타카로틴을 홀스타인 거세우에 급여하였을 때, 분 건조 g당 4.03, 14.91 및 90.64 μg 으로 유사한 양상을 나타내었다.

- 또한, 전장 영양소소화율은 비섬유성탄수화물을 제외한 전 영양소에서 베타카로틴 섭취수준이 증가함에 따라 유의하게 증가하였다($P < 0.05$; 1차 및 2차 효과). 또한, 조단백질 및 베타카로틴 소화율은 공히 1차 및 2차적으로 섭취수준이 증가함에 따라 유의하게 증가하였다($P < 0.05$).

- 베타카로틴 소화율은 200, 400 및 600 mg 섭취구에서 각각 73.7, 82.1 및 83.8%로 나타났고, 이들 소화율은 실험여건 상 십이지장 캐놀라 장착 소가 부재하여 반추위내 분해 정도 및 십이지장 하부소화기관의 흡수정도를 평가할 수 없지만, 전반적으로 70%이상으로 높게 나타났고, 이들은 Mora 등(2001)의 연구에서 나타난 66.25~88.14%의 전장소화율 결과와 유사하였고, 섭취수준이 증가함에 따라 베타카로틴 소화율도 유의하게 증가하여 본 연구와 일치하였다.

- 한편, Wing(1969)은 조사료에 함유되어 있는 베타카로틴 및 건물의 소화율시험을 유용종 거세우를 대상으로 실시하였을 때, 그의 연구에서 카로틴과 건물소화율은 각각 77.7% 및 55.3%로 나타났고, 카로틴의 소화율은 조사료생산월, 조사료형태(사일리지, 건초, 절단청초, 방목초), 초종(화본과 및 콩과) 및 조사료내 건물함량의 영향을 받는 것으로 보고되었다.

Table 6. Simple linear regression analysis for variables against beta-carotene intakes

\hat{y} =	Variable	Parameter Estimate	SE	P-value	RMSE	R ²
Fecal carotene ($\mu\text{g/g}$)	Intercept	10.5944	5.774			
	[BC] _{Intake}	0.0325	0.014	0.0231	12.4218	0.1605
DM digestibility (%)	Intercept	43.9122	2.231			
	[BC] _{Intake}	0.0015	0.005	0.7834	4.7991	0.0026
OM digestibility (%)	Intercept	48.7785	1.762			
	[BC] _{Intake}	0.0022	0.004	0.6030	3.7912	0.0091
CP digestibility (%)	Intercept	49.1473	1.943			
	[BC] _{Intake}	0.0000	0.005	0.9919	4.1788	0.0000
EE digestibility (%)	Intercept	53.5321	2.746			
	[BC] _{Intake}	0.0006	0.006	0.9239	5.9063	0.0003
BC digestibility (%)	Intercept	72.2752	4.614			
	[BC] _{Intake}	0.0201	0.011	0.0739	9.9065	0.1060
NDF digestibility (%)	Intercept	43.3060	2.565			
	[BC] _{Intake}	0.0093	0.006	0.1394	5.4595	0.0738
NFC digestibility (%)	Intercept	56.6508	3.633			
	[BC] _{Intake}	-0.0086	0.008	0.3021	7.3146	0.0367

\hat{y} = estimated dependent variable; DM : dry matter; OM : organic matter; CP : crude protein; EE : ether extract; BC : beta-carotene; NDF : neutral detergent fiber; NFC : non-fibrous carbohydrate; SE : standard error; RMSE : root mean square error; [BC]_{Intake} : beta-carotene intake.

- 특히, 중성세제불용성섬유소 소화율은 섭취수준이 증가함에 따라 전 처리구간 유의하게 직선

적으로 증가하여, 반추위에서 일부 분해된 베타카로틴에 의하여 반추위내 서식하는 섬유소분해 박테리아의 활력에 유리하게 작용한 것으로 판단된다. Hino 등(1993)은 홍화씨유 존재 하에 베타카로틴 첨가로 셀룰로스 분해와 반추위 박테리아성장을 증가시켰다고 보고하여 베타카로틴의 섬유소분해 향상가능성을 제시하였다.

- 건조분 중 베타카로틴 농도 및 영양소소화율과 섭취되는 베타카로틴량과의 단순직선회귀식을 분석한 결과, 단순직선회귀모델의 분중 베타카로틴을 제외한 소화율과의 관계식은 유의성이 나타나지 않았고, 분중 베타카로틴농도와 섭취 베타카로틴 간의 관계식은 16%(R² = 0.1605)에 불과해 설명력이 낮았다.

○ 농가실증시험Ⅱ : 수정란 이식 수태율 조사

본 연구진에 의해 개발된 보호 베타카로틴제제를 수정란이식농가를 대상으로 실제 급여를 통하여 수태율이 증가하는지 검증하기 위하여 실시하였다.

연구 수행 방법

1. 공시축 배치 및 사양관리

본 연구기관에서 시행하는 『우량한우 수정란이식지원사업』에 참여하는 경남 합천군 소재 ○○혈통사업장의 분만전후 번식한우 71두를 선정하여 급여 실증시험을 수행하였다. 베타카로틴 비급여구와 급여구로서 급여구는 경화유기반 보호베타카로틴 및 교차결합기반 베타카로틴(DSM Nutritional Products Korea Ltd)으로 하였으며, 이들 처리구는 각각 20두, 27두 및 24두로 공시하였고, 급여구는 수정란이식 전 60일부터 매일 두당 400mg의 베타카로틴이 함유된 제제를 각각 섭취시켜 임신여부 확인 시(이식 후 60일)까지 급여하였다.

시험에 참여하는 한우 대리모는 합천축협에서 생산된 발효TMR사료를 1일 2회 매일 두당 9kg을 급여하였다.

2. 대리모의 수정란이식 시술, 임신감정

대리모의 수정란이식 시술은 자연발정이 확인된 개체에 대하여 이식 전(발정확인후 7일) 난소내 황체상태를 확인한 후 신선수정란을 이식하였다. 임신감정은 이식 후, 45일 전후로 직장촉지 및 육안상 재발정 여부로 임신여부를 확인하였다.

3. 채혈, 베타카로틴 분석

□ 채혈

- 수정란 이식예정우에 대하여 이식 시행하기 전 혈액(10ml)을 채취하였으며, 혈액은 경정맥을 통하여 채취하였다.

- 채취된 혈액은 빛과 온도에 의한 베타카로틴의 파괴를 막기 위하여 즉시 알루미늄호일(aluminum foil)로 튜브를 감싼 후 얼음박스에 넣어 실험실로 운반하였다.

- 운반된 혈액샘플은 외부 빛이 완전 차단된 실험실에서 원심분리기를 이용하여 3,000×g에서 10분 동안 원심분리 후 상층액 2ml를 튜브에 저장한 후, 즉시 -80℃ 저온냉장고에 분석 시까

지 보관하였다.

□ 혈중 베타카로틴 분석

- 혈중 베타카로틴은 Schweigert 등 (2007)의 방법에 따라 one-step denaturation 및 유기용매 추출 후, iEXTM assay system에 의하여 소 혈액 전용 carotene photometer (iCheckTM; BioAnalyt GmbH, Germany)를 이용하여 분석하였다.

4. 통계분석

- 모든 자료는 SAS(SAS Institute, 2011)의 Freq procedure를 이용하여 카이스퀘어검정법으로 분석하였다.
- 평균값은 LSMEANS procedure를 이용하여 산출하였다. 유의성은 P값 0.05이하일 때 유의성이 인정되고, 경향은 0.10이하로 인정하였다.

연구 수행 결과

- 본 연구진에 의해 개발된 보호베타카로틴제제를 농가에 실제 급여해본 결과, 수태율은 무급여구 및 급여구간에 유의한 차이가 나타나지 않았고, 이들은 각각 40%, 40.7% 및 41.66%로 거의 유사하여 수정란이식을 통한 수태율향상 효과에는 미흡하였다.
- 하지만, 혈중 베타카로틴농도는 무급여구보다 급여구에서 각각 3.0 및 4.4 mg/L로 3.9내지 5.8배 유의하게 높았다($P < 0.001$). 본 결과로 미루어 개발된 반추위 비분해성 베타카로틴은 장내 흡수효율이 양호한 것으로 판단되었고, 교차결합기법을 이용한 베타카로틴은 경화유소재 코팅을 통한 개발베타카로틴보다 유의하게 높게 나타나, 본 연구의 개발품 보다 우수하게 평가되었다.
- 하지만, 수정란이식 전날 혈액을 채취하여 혈중 베타카로틴 농도를 분석함에 따라, 교차결합에 의한 베타카로틴제제가 섭취기간이 10.8일 가량 더 길게 섭취한 시점에 채혈하여 교차결합에 의한 베타카로틴이 더 높은 농도로 나타난 것으로 판단된다.
- 본 연구에서 급여군 및 비급여군간에 수태율성적이 1차 실증시험(남해 실증시험)과 달리 나타난 것은 아마도 실험에 참여한 번식한우의 두수가 부족하여 유의한 결과로 도출하기에는 미흡하였다.

Table 7. Effects of feeding rumen undegradable beta-carotene supplements on pregnancy rates and plasma concentrations in postpartum Hanwoo cows as recipient cows for embryo transfer

	Treatments			SEM	< P
	Control ¹⁾ (n = 20)	HF-coated BC ²⁾ (n = 27)	Cross-linked beadlet based BC ³⁾ (n = 24)		
Parity	2.73	2.38	2.70	0.4541	0.8198
Age, month	52.21	45.26	50.67	5.6292	0.6475
Supplementation to ET ⁴⁾ (d)	-	90.46	101.21	5.5680	0.1785
No. cows with pregnancy ⁵⁾	8 / 20	11 / 27	10 / 24	-	0.9937
Pregnancy rate, %	40.00	40.74	41.66		
Plasma beta-carotene, mg/L	0.76 ^c	3.00 ^b	4.40 ^a	0.2677	<0.0001

^{a,b,c}Means with the same superscripts are not significantly different at a level of $P < 0.05$; ¹⁾No supplemental β -carotene; ²⁾hydrogenated fat coated β -carotene; ³⁾cross-linked beadlet based β -carotene, which is donated from DSM nutritional products Korea Ltd.; ⁴⁾ET = embryo transfer; ⁵⁾number of pregnant cows per number of total cows for embryo transfer.

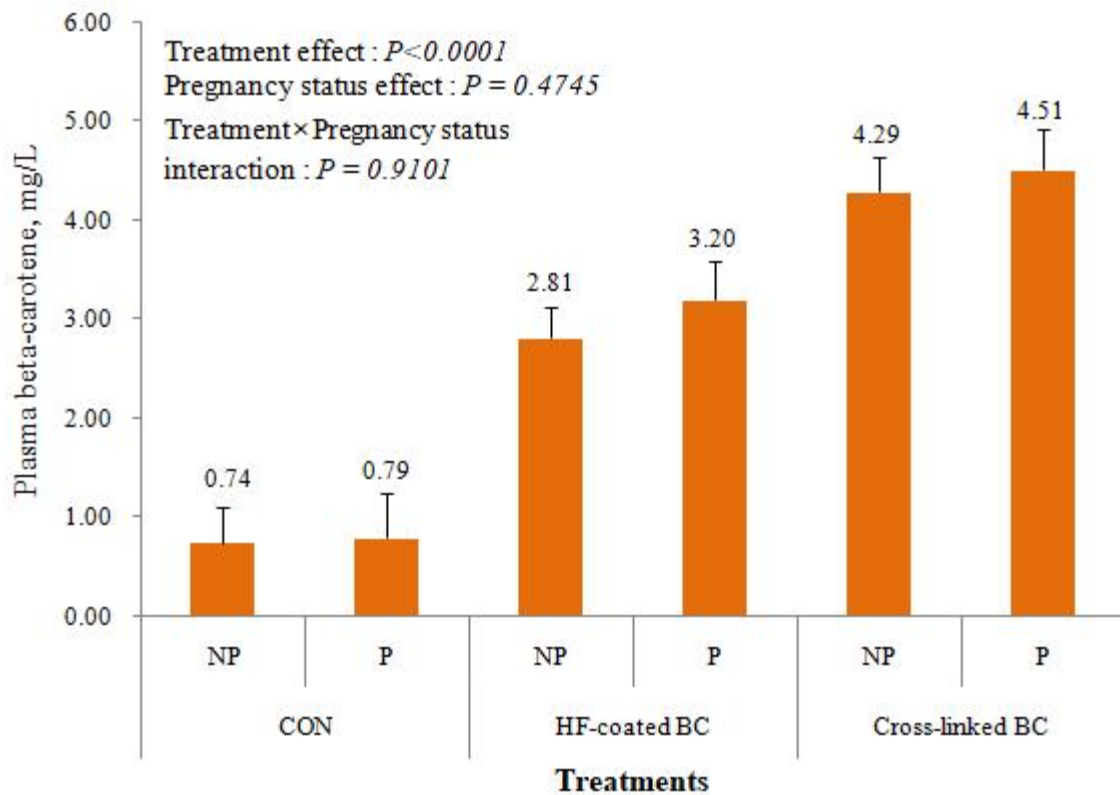


Fig 4. Plasma beta-carotene concentration (mg/L) depending on pregnancy status of Hanwoo cows fed rations with or without beta-carotene supplements ; CON = no supplements ; HF-coated BC = hydrogenated fat coated beta-carotene; Cross-linked BC = cross-linked beadlet based beta-carotene ; NP : non-pregnancy; P : pregnancy.

- 그림 4는 2종의 베타카로틴제제 각각을 급여한 우군과 무급여한 우군의 수정란이식 수태여부에 따른 혈중 베타카로틴 농도를 보여주는 것으로, 베타카로틴 급여군과 무급여군 그리고,

베타카로틴의 제조방식에 의하여 유의한 혈중 농도 차이를 보여주었다. 하지만, 각 처리구내 수태여부에 따른 혈중 농도 차이는 거의 나타나지 않았지만, 수태군이 비수태군에 비하여 수치적으로 극히 조금 높아지는 것으로 나타나, 시험참여 조사두수가 더 많았다면, 수태율에 긍정적인 효과의 가능성을 확인할 수 있을 것으로 판단된다.

농가실증시험Ⅲ : 보호베타카로틴 급여가 소 인공수정 수태율에 미치는 영향

본 연구진에 의해 개발된 보호 베타카로틴제제를 인공수정 전 번식우에 실제 급여하여 수태율을 조사하였다.

연구 수행 방법

1. 공시축 배치 및 사양관리

본 연구기관에서 사육하는 수정대기중인 번식한우 86두를 공시하여 급여 실증시험을 실시하였다. 베타카로틴 비급여구에는 32두의 암소를 공시하였고, 보호베타카로틴 급여우는 급여기간(6주 및 10주)을 달리하여 각각 27두 및 27두로 공시하여 인공수정전 4주에서 수정후 2내지 6주간 매일 200 g(0.2%함유, BC 400mg)씩 급여되도록 하였다.

시험에 참여하는 번식우 한우 암소는 조사료로서 티모시를 먼저 자유채식시키고, 번식우 배합사료를 1일 두당 2~3kg을 오전 오후 균등하게 급여하였다.

2. 발정관찰, 인공수정 및 임신감정

시험에 참여한 번식우의 발정관찰은 체온과 활동량 센서가 장착된 바이오캡슐을 소 반추위에 삽입하여 24시간 개체별 생체 모니터링 시스템(LiveCare™, Seoul, Korea)의 사물인터넷기술을 통하여 실시간 발정관찰을 실시하였고, 모든 개체가 동일한 조건에서 인공수정이 되도록 모바일 앱(mobile application)에서 활동량증가가 감지되면 발정여부를 확인하고, 발정이 확인된 개체에 한하여 수정시간은 체온이 미열상태로 유지되다가 온도가 하강하는 시점에 맞추어 수정을 실시하였다. 재발여부와 관계없이 발정주기당 인공수정횟수는 1회 실시하였다. 임신감정은 수정 후 60일이 되면 직장촉지 또는 육안상 재발정여부로 확인하였다. 수태되지 않은 개체에 대하여는 최대 3차 발정까지 인공수정하여 수태율을 조사하였다.

3. 통계분석

- 모든 자료는 SAS(SAS Institute, 2011)의 Freq procedure를 이용하여 카이스퀘어검정법으로 분석하였다.

- 평균값은 LSMEANS procedure를 이용하여 산출하였다. 유의성은 P값 0.05이하일 때 유의성이 인정되고, 경향은 0.10이하로 인정하였다.

연구 수행 결과

- 본 연구진에 의해 개발된 보호베타카로틴제제를 번식우에 60일간 실제 급여해본 결과, 번식

를에 대하여 급여구에서 각각 74 및 70%로 대조구의 44%보다 높은 번식률을 나타내었다. 전체 수태율은 급여구가 대조구보다 11 ~ 15.85%의 개선효과를 나타내어 실제 반추위 보호 베타카로틴 급여가 번식우의 수태율 향상의 가능성을 보여주었다. Aréchiga 등(1998)은 젖소에 90일 이상 베타카로틴을 급여하였을 때, 분만 120일의 수태율이 대조구 대비 급여구에서 유의하게 높게 나타났을 뿐만 아니라(35.4% vs 21.1%), 유량도 증가하였다고 보고하였다.

- 또한, 수태당 수정횟수가 대조구에서 2.9회로 베타카로틴 급여구에서 2내지 2.2회로 수정횟수를 대조구보다 0.7내지 0.9회 줄일 수 있어, 수정비용 절감효과도 기대 할 수 있을 것으로 생각된다. 본 연구결과로부터, 번식우의 베타카로틴 급여는 번식률개선과 수정횟수 감소로 장기적으로 한우 암소의 분만간격과 공태기간을 단축시킬 수 있을 것이다.

- Tekpetey 등(1987)은 계절에 따라 우사에서 키우는 겨울/봄에 비하여 목초를 섭취하는 여름/가을철 홀스타인 암소가 혈중 베타카로틴 농도를 적정하게 유지하였고(240±14 ~ 339±19 µg dL⁻¹), 이들은 분만후 자궁퇴축, 초종부간격 및 공태일수가 유의하게 개선되었다고 보고하였다.

- 본 연구에 의하면, 한우 번식우의 수정방법(수정란이식 vs. 인공수정)에 따라서도 베타카로틴 급여효과가 다르게 나타났고, 가임암소에 대하여 수정란이식은 다양한 요인(수정란품질, 수란우의 생식기상태, 시술자의 숙련도 및 사양환경 등)이 상존하기에 베타카로틴 급여에 따른 효과를 나타내기 위해서는 보다 많은 두수가 필요할 것으로 사료되나, 인공수정은 적은 두수로도 수태율향상 가능성을 확인 할 수 있어 인공수정 소에 보다 유리하였다.

Table 8. Effects of supplemental rumen undegradable β-carotene on reproductive performances of Hanwoo cows

Treatment s	Supplementati on period, d	Parity	Conception rate (%)				No. of service per conceptio n	Pregnan cy rate (%)
			At first AI ³⁾	Re-estrus		Total		
				At 2 nd AI	At 3 rd AI			
Control ¹⁾ (n=32)	-	2.26	34.38 (11/32)	28.57 (2/7)	50.00 (1/2)	34.15 (14/41)	2.9 43.75 (14/32)	
β-carotene ²⁾ (n=27)	42	2.48	37.03 (10/27)	57.14 (8/14)	66.66 (2/3)	45.45 (20/44)	2.2 74.07 (20/27)	
β-carotene ²⁾ (n=27)	70	2.56	44.44 (12/27)	70.00 (7/10)	0.00 (0/1)	50.00 (19/38)	2.0 70.37 (19/27)	
P<	-	0.8933	0.7198	0.2336	0.5134	0.3366	- 0.0307	

¹⁾Control = No supplemental β-carotene; ²⁾ 400 mg/d of supplemental β-carotene per cow;

³⁾AI : artificial insemination; numbers in parentheses represent number of pregnant cows per number of total cows inseminated.

제 4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1절. 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

1. [1년차]

		코드번호		C-03-02
구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
1차 년도 (2017)	난포과동주기 유래 OPU 수 정란 생산의 현장 적용기술 확립	○ 무혈청배지 배양체계 구축	SOF 기본배지에 여러 가지 성장인자 및 혈청을 첨가하여 최적의 배지 조성 구축	무혈청배지(SOF+ITS+EGF) 기반의 배양체계를 개발하여 배반포발생율과 총세포수의 유의적인 증가, 지질함량의 저하, mtDNA 함량의 증가를 보였다. 또한 질적수준을 평가할 수 있는 다양한 유전자의 발현이 유의적인 차이를 보였고, 체외 침투능력의 평가에서도 무혈청배지 유래 수정란의 수준이 유의적으로 높았음
		○ 수정란의 저온저장 기반기술 확보	무혈청 배지에서 생산된 수정란의 저온수송에 대한 효율성 분석	무혈청 및 혈청배지 유래 수정란을 저장저온 3일(72시간) 후 생존율과 질적수준을 비교분석한 결과 무혈청유래 수정란의 질적수준, 즉 생존율, 지질함량, 미토콘드리아 활성도 등에 유의적인 차이를 보였음
		○ 전사억제인자 조절에 의한 수정란저장 기반기술 확보	수정란의 저온저장 능력 향상과 저장기간의 연장을 위해 전사억제인자 조절에 의한 기반기술 확보	전사억제인자 조절함으로써 수정란의 저온저장 기간을 획기적으로 연장시킬 수 있는 기술을 개발하고자 함. 전사억제인자 조절하지 않은 상태에서는 3일간 100% 생존율을 보였지만 그 이상의 저온저장 기간의 연장에서는 생존율이 급격히 감소하여 이러한 새로운 기술개발이 요구됨
		○ 세포외기질 침투능력	세포외기질(MMP2 & 9)	수정란의 착상율을 높이기

	향상 기반기술 확보(생쥐)	을 이용한 수정란의 침투능력의 향상 시스템을 개발	위해서 세포외기질의 처리 및 공동이식기술을 개발하고자 함. 예비실험으로 생쥐를 모델로 개발하고자 함. 자궁관류액 및 혈장에서 MMP-2 & -9의 적정농도를 결정하고 이를 이용한 체외 침투능력을 비교하여 체내 이식 시 공동이식으로 수태율을 향상시키고자함
OPU유래 수정란의 질적 향상 관련 현장 적용기술 확립	○ 연구용 공란우 선발 및 질병검사 우 입식	공란우의 질병유무, 직장검사를 통한 번식장애 유무 등을 파악하여 공란우 선발	본 실험에 선별되는 공란우는 자체 보유한 4두를 포함 경남 축산시험장 4두를 임대하여 총 8두를 선별하여 4대 질병에 문제가 없으면서 번식기관, 특히 난소의 발육상태가 우수한 6두를 선발하여 공시하였다.
	○ 난포파동주기별 난포의 발육상태 분석에 의한 분류기준 확립	선별된 공란우를 호르몬 처리를 통하여 배란을 유도한 후 1주일 후부터 주 1회 모든 난포를 채란하여 분석을 실시	난자를 채취하기 전 호르몬 처리를 통하여 배란을 확인하고 일주일 뒤에 모든 난포를 채취하였다. 그로부터 주 1회 채란하여 실험에 GV단계의 난자를 분석하였다.
	○ 난포파동주기별 채취난자의 GV단계 분석에 의한 공란우 분류기준 확립	채취된 난포는 염색을 통하여 GV 단계를 확인하고 GVII 단계의 난자를 확인	OPU를 통하여 채취된 난자는 염색을 통하여 GV 단계별 형태를 확인하였으며 GVII 단계의 난자를 확인하였다. 이를 통하여 2 또는 3주기를 확인하였다.
수태율 향상을 위한 베타카로틴 적정급여수준 결정구명	○ 혈액대사물질 참고치 설정으로 대리모 선발 기준제시	수정란이식우를 농가에서 200두 선정 혈중 대사물질 분석 및 농가실태조사	당해 11월 현재까지 분석 완료된 개체 105두를 가지고 통계분석한 결과, 수태우와 비수태우간에 지질관련 대사물질인 혈중 총콜레스테롤 및 glucose가 유의한 차이를 나타내었고, 이들의 참고치는 각각 99-118 및 63-67 mg/dL로 나타났다. 하지만, 전체

			<p>채혈두수의 1/2 수준에 해당하는 결과라 분석중인 결과를 합치면 보다 정확도가 높아질 것으로 판단된다. 또한 β-carotene 농도는 두 그룹간 차이가 나타나지 않았으나, 사료급여 방식 및 조사료원에 따라 큰 차이가 나타나, 벗짚위주의 급여방식은 가임암소에 적합하지 않은 것으로 조사되었고, 전반적으로 외국의 권장수준에 미흡한 것으로 나타났다.</p>
	<p>○ 시판 베타카로틴의 급여를 통한 혈중 베타카로틴 농도조사</p>	<p>시판 베타카로틴을 가임암소 9두에 3처리구(처리구당 3두배치)로 12주간(3 periods, period당 4주) 급여시험을 실시하여 영양소섭취량, 혈중 베타카로틴농도, retinol 및 혈중대사물질을 조사하였다.</p>	<p>시판 베타카로틴제제 2수준(100 g 및 300 g/두/일)으로 설정하여 급여한 결과, 장점막까지 이행하지 못하고 대부분이 그 이전 단계(반추위)에서 파괴되는 것으로 나타났고, 혈중 농도 또한 대조구 수준으로 나타났다. 또한 β-carotene이 retinol로 전환된다 하더라도, 혈중 retinol수준은 대조구 수준보다 낮거나 비슷한 수준인 것으로 조사되었다.</p>
	<p>○ 개발된 베타카로틴의 in vitro 검증</p>	<p>보호처리 베타카로틴의 반추위 안정성 검증</p> <ul style="list-style-type: none"> ▶ 비보호 및 보호 β-carotene을 in vitro 반추위 배양시험실시 ▶ pH와 β-carotene 소실율 조사 	<p>In vitro 시험완료 및 시료 중 β-carotene 분석중.</p> <p>In vitro 반추위 pH 결과에 비추어 대조구 (비보호 β-carotene)가 처리구 (보호 β-carotene)보다 유의하게 낮게 나타나, 처리구가 덜 분해되는 것을 간접적으로 시사하였다.</p>

2. [2년 차]

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
2차 년도 (2018)	OPU유래 수정란의 질적 수준 분석 및 이식 적용기술 확립	○ 무혈청배지 유래 수정란의 질적수준 분석 및 이식 적용	무혈청배지를 기반으로 OPU 유래 수정란의 생산 효율 향상기술 개발 및 이들을 농가 현장에 직접 이식하여 수태율 결과 확보	SOF 배지를 기반으로 하는 무혈청배지에 ITS를 첨가하여 OPU유래 수정란의 효율적인 생산기술을 개발하였음. 혈청을 대체할 수 있는 BSA첨가구와 무혈청구에서 혈청첨가구에 비해 체외성숙율은 유의적인 차이가 없었으나, 과립막세포의 팽창율에서는 유의적으로 낮았다. 수정란의 생산효율에서는 유의적인 차이가 없었다. 또한 총 세포수 및 사멸세포 수 등의 질적수준은 BSA처리구가 FBS처리구와 유의적인 차이가 없었으나, 무혈청처리구에서는 유의적으로 낮았다. 그러나 특이하게도 미토콘드리아 활성화는 혈청처리구보다 BSA 및 무혈청 처리구에서 유의적으로 높았다. 동결수정란의 생존율은 혈청첨가 및 BSA 처리구에서 유의적으로 높아 수정란의 질적분석에 따른 수정란의 생산체계를 구축하는 것이 반드시 필요하다. 1차년도에 개발된 배지유래 OPU 수정란의 이식결과 평균 47.6% 수태율을 보였다.
		○ 저온저장기술 유래 수정란의 질적 수준 분석 및 이식 현장 적용	저온저장 및 저온수송에 의한 수정란이식의 현장 적용에 의한 수태율을 검증하고 적용 가능성을 조사함	보온수송 및 저온저장에 의한 저온수송에 의한 수정란이식의 현장 적용은 각각 185두와 68두를 현장 이식하여 현재까지 임신감정을 실시한 결과 49.7%와 51.9% 수태율을 확인하였다. 즉 수송방법에 의한 수태율은 차이가 없었으며 실제 현장적용이 가능하다는 것을 확인할 수 있었다.
		○ 전사억제인자 유래 수정란의 질적 수준 분석 및 이식 적용	전사억제인자의 처리에 의한 수정란의 저온저장 기간을 확대할 수 있는	소 수정란의 저온저장 기간을 확대하기 위해서는 전사억제인자를 보존배지

		<p>기술을 개발하고자 하였음. 소의 경우에는 in vitro 연구위주로 실시하였고, 생쥐의 경우는 in vitro 및 이식실험으로 실시하였음</p>	<p>에 첨가함으로써 4,5,6일까지 저온보존 후 생존율이 매우 높았다. 그러나 부화율이 낮은 성적을 보여 이에 대한 개선책이 반드시 마련되어야 할 것으로 판단된다. 전사억제인자의 첨가는 저온저장 후 수정란의 질적회복에 크게 영향을 미치는 것으로 판단되며 실제 생존율의 개선에 큰 영향을 미치는 것으로 판단된다. 이러한 기술을 기반으로 생쥐수정란에 적용하여 이식 후 수태율까지 확인한 결과 신선란에 비해 생존율과 부화율은 낮았지만, 대조구 처리구에 비해서는 유의적으로 높았다. 임신율에서는 신선란과 차이가 없었으나, 산자생산물과 임신기간에서는 신선란과 유의적인 차이를 보였다. 이러한 부분에 대한 해결책을 3년차에는 개선할 필요성이 있다.</p>
	<p>○ 수정란의 자궁외기질 침투능력 제외분석기법 및 기반기술 확립(소)</p>	<p>자궁외기질 침투능력을 비교분석하여 수태율을 높이기 위한 기술개발을 실시하였다. 생쥐에서 이식까지 실시하였고, 소에서는 in vitro invasion 분석으로 대체하여 예비결과를 확보함</p>	<p>자궁외기질 침투능력에 가장 중요한 요인은 MMP-2 & -9의 발현량과 이들의 공동이식에 의한 실제 착상율을 높이고자 하는 연구를 생쥐에서 실시한 결과 수정 후 2.5일에 가장 높은 수준의 MMP-2 & -9이 발현되었다. In vitro invasion 분석에서 100 ng/ml MMP-2 & -9 첨가 시 영막배양의 침투능력이 유의적으로 증가함을 확인하였다. 또한 임신율은 MMP-9 첨가구에서 높았고, 산자생산율도 MMP-2 & -9 처리구에서 대조군에 비해 유의적으로 높았다. 소 수정란의 경우 13일째 부착된 수정란과 부착되지 않은 수정란의 MMP-2 & -9 발현율을 비교하였고, 단백질 발현율을 비교한 결과에서 부</p>

			<p>착된 수정란에서 MMP-9이 유의적으로 높게 발현됨을 확인하였다. 소 수정란의 경우 MMP-9이 초기 착상과정에서 유의적으로 높은 영향을 미칠 수 있음을 간접적인 결과로 예측해 볼 수 있었다.</p>
난포파동주기 유래 OPU 수정란생산의 현장적용기술 확립	<p>○ 걱정 난포파동주기 유래 GVII 단계난자 채취 효율 비교분석</p>	<p>OPU 채란에서 GNVII stage 난자를 채취하여 배반포 발달을 및 효율을 높이고자 follicular wave를 이용한 OPU 채란을 및 수정란 생산효율을 비교분석을 실시함</p>	<p>공란우 8두에서 2 또는 3 난포파동을 분류하여 각각 4두씩 분리하여 각각 10일 및 7일 간격으로 OPU 채란을 실시하여 GVII stage 난자의 채취율과 이들의 배반포 발달을 비교분석하였다. 3 난포파동 공란우로부터 GVII 난자의 채취효율은 약 60.3%로서 2난포파동의 46.6%보다 유의적으로 높았다.</p>
	<p>○ GVII 단계 난자유래 OPU 수정란 생산효율 비교분석</p>	<p>2 또는 3 난포파동의 공란우로부터 채취된 GVII 난자를 이용한 수정란의 생산효율을 비교분석함</p>	<p>이들로부터 배반포배 발달을 조사한 결과 3난포파동 공란우의 난자들의 발달율은 30.4%를 얻었다. 그러나 2난포파동의 공란우로부터는 배반포수정란의 생산효율이 너무 낮아 연구를 지속하지 못하였음. 기존의 OPU채란 방법에 의한 수정란의 생산효율은 29.1%로서 3난포파동 공란우의 채란방법에 의한 채란 및 수정란의생산효율은 유의적인 차이가 없었다.</p>
수태율 향상을 위한 대리모의 사양관리 및 선발기준 확립	<p>○ 혈액대사물질 참고치 설정으로 대리모 선발기준 제시 (1차년도 미완부분)</p>	<p>수정란이식우를 농가에서 200두 선정 혈중 대사물질 분석 및 농가실태조사</p>	<p>농가 수정란이식에 참여한 대리모 200두에 대한 통계 분석한 결과, 수태우와 비수태우간에 지질관련 대사물질인 혈중 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 및 glucose가 유의한 차이를 나타내었고, 이들의 참고치는 각각 114-128, 106-120 및 65.9-68.8mg/dL 으로 나타났다. 또한 β-carotene농도는 두 그룹간 차이가 나타나지 않았으나, 전반적으로 외국의 권장수준에 미흡한 것으로 나타났다.</p>
	<p>○ 개발된 베타카로틴의 <i>in vitro</i> 검증 (1차년도 미</p>	<p>보호처리 베타카로틴의 반추위 안정성 검증</p>	<p>국내 시판제품(비보호)과 개발제품(encapsulation)을 <i>in</i></p>

		<p>완부분)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 비보호 및 보호 β-carotene을 <i>in vitro</i> 반추위 배양시험 실시 ▶ β-carotene소실을 조사 	<p><i>vitro</i> 반추위액에 의한 12시간 배양결과, 보호 및 비보호제품간에 극명한 차이를 보였고, 보호제품은 70.85%가 분해되지 않은 채 유지된 반면, 비보호제품은 73%가량 분해되어 반추위내 불안정성이 관찰되었고, 개발제품은 반추위내 안정성이 확인되었다.</p>
	<p>○ 보호 베타카로틴의 생체 안정성 검증 및 적정급여형태 구명 (사양시험 II)</p>	<p>여러 가지형태의 베타카로틴 형태 제조 및 체내 이용성 조사</p> <ul style="list-style-type: none"> ▶ 형태 : 무급여구(NBC), 비보호제품(UBC), 보호BC(PBC) 및 보호BC+비타민A복합(PBCA) ▶ 형태별로 임신한우 3두씩 총 12두 공시, 4Periods 16주 사양시험 ▶ Period당 채혈 및 혈중 BC 및 대사물질 조사 ▶ 최적의 급여형태 결정 	<p>4가지 급여형태중 PBC 및 PBCA구의 혈중 베타카로틴 농도가 UBC구 대비 1.8배, NBC구 대비 3배까지 증가하여 보호처리로 혈중 높은 수준으로 유지 되었다. 하지만, PBC 및 PBCA구간에 통계적인 차이 없이 각각 132 및 133 $\mu\text{g}/\text{dl}$으로 나타나, 비타민A와 같이 보호할 필요가 없는 것으로 보였다. 또한 PBCA군에서 혈중 retinol수치가 다른 군에 비하여 낮게 나와 베타카로틴이 소장에서 비타민A 흡수를 방해하는 것으로 보였다. 따라서, 최적의 형태는 베타카로틴 단독보호가 가장 적합하였다.</p>	
	<p>○ 저수태우에 대한 보호 BC급여 및 수정란이식 수태율조사 (실증시험)</p>	<p>개발 보호베타카로틴제제 농가실증시험을 통하여 수태율조사</p> <ul style="list-style-type: none"> ▶ 수정란이식 수란우 186두 공시 (남해군 ○○생축장) ▶ 시판제품구(비보호구) 및 개발제품(보호구)로 나누어 각각 92두 및 94두 배치 ▶ 발정동기처리로 발정을 유도한 후 수정란이식 시행 ▶ 이식전 60일부터 이식후 60일까지 120일간 해당 베타카로틴을 급여(400 mg BC/일) ▶ 이식 60일전후하여 임신 감정시행하여 수태율 조사 	<p>본 실증시험에 참여한 농가는 우량한우 수정란이식지원 사업에 참여 중인 농가로 기존 참여농가중 수태율이 20%미만으로 저조한 저수태우를 대상으로 수행하였음. 수정란이식시기는 하절기(6,7,8월)였음. 그 결과 수태율은 시판제품(비보호) 급여구가 20.65%, 개발 보호베타카로틴 급여가 28.72%로 비보호구에 비하면, 8%증가하였고, 상대적으로 환산하면 139%가 증가한 결과임. 하지만, 통계적인 유의성은 나타나지 않았다. 혈중 베타카로틴농도는 각각 38.07 및 82.43$\mu\text{g}/\text{dl}$로 비보호보다 높았음.</p>	

3. [3년차]

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
3차 년도 (2019)	OPU유래 수정란의 질적 수준 분석 및 이식 적용기술 확립	○ 무혈청배지 유래 수정란 생산기술 확립	무혈청 배지를 활용하여 수정란 생산 및 현장의 이식을 통하여 생산효율 및 수태율 확인	혈청과 무혈청 그룹의 수정란 생산효율을 분석한 결과 배반포 분할율에서는 혈청그룹(62.8%) 보다 무혈청 그룹(65.8%)이 높았으며, 수정란 생산효율은 혈청그룹(35.7%)에 비하여 무혈청 그룹(46.1%)이 유의적으로 높았다. 이식결과 혈청그룹은 54.7%, 무혈청 그룹은 56.4%(135/47두)에서 임신을 확인하였다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 무혈청 배지를 이용한 수정란 생산 및 이식의 현장 적용이 가능한 것으로 판단된다.
		○ 수정란의 장기저장기술 유래 수정란이식 현장 적용기술 확립	장기저장기술을 활용하여 수정란 이식 시 보온수송을 통한 당일 이식과 저온 수송을 통한 3일 이내 이식을 통한 수태율 확인	8개 지역으로 확대하여 연구를 진행한 결과 임신율은 보온수송(52.0%), 저온수송(49.0%)의 결과로 유의적 차이를 보이지 않았다. 저온수송의 장점인 3일 이상의 사용을 통하여 최대 주 6회 이상의 수정란 공급이 가능하여 시간적 공간적 한계성을 극복할 수 있음으로써 수정란의 수송 및 저장에서 현장적용에 매우 효과적으로 판단된다.
		○ 동결수정란 생산효율 개선 및 수정란 이식기술의 개선에 의한 수태율 향상	수정란 이식기술의 효율성을 높이기 위하여 동결기술을 개발하여 최적의 동결 방법을 적립하고 기존의 동결방법과 비교 후 현장적용을 통한 효율성 확인	Exp BL에서 생존율(100%)과 부화율(81.2%)이 극대화 되었으며, 기존 동결방식에 비하여 생존율은 84.5%에서 97.7%, 부화율은 58.0%에서 73.3%로 개선되었다. 이식에서 수태율은 신선란(52.0%)에 비하여 동결란(45.0%)으로 유의차가 없었으며, 본 연구의 목

			표수준인 50%에 근접한 결과를 확인하였다.
난포파동주기 유래 OPU 수정란생산의 현장적용기술 확립	○ 난포파동주기 유래 수정란 생산효율 향상기술 확립	난포파동주기 유래 수정란 생산을 통하여 2-3파동기들의 공란우를 분류한 후 충분한 휴식기간을 가진 후 수정란의 생산효율성 분석	2, 3회 파동주기의 공란우로부터 수정란 생산효율은 27.2%, 33.4%로서 3회 파동주기의 경우 2차년도에 30.4%에 비하여 개선됨을 확인하였다.
	○ 난포파동주기 활용 OPU 수정란이식 현장적용기술 확립	난포파동주기 유래 수정란 생산을 통해 생산된 수정란의 이식 후 수태율 조사	총 109회 채란을 통하여 2678개의 난자를 회수하였으며 부화율은 1651개(61.7%), 수정란 생산은 836개(31.2%)의 결과를 확인하였다. 2차년도에 기재하지 못한 수태율 또한 조하였는데 2차년도에 51.3%, 3차년도에는 48.0%의 임신감정결과를 확인하였다. 이상의 결과를 통하여 난포파동주기를 이용하여 수정란 생산의 현장적용에는 어려움이 있으며 이를 개선하기 위해서는 추가적인 연구가 진행되어야 할 것으로 판단된다.
수태율 향상을 위한 대리모의 사양관리 및 선발기준 확립	○ 사양시험 : 농가관행 이 사용되는 시판 베타카로틴의 효용성 조사	9두의 공시축을 선정한 후 3두씩 3그룹으로 구분하여 베타카로틴 재제 급여하였다. 각 그룹은 무첨가구, 권장수준구, 과잉급여구로 구분하여 12주간 진행 후 혈액을 채취하여 분석함	시판되고 있는 β -carotene 제제는 장점막까지 대부분 도달하지 못하며 이는 장점막 도달이전에 반추위 내에서부터 대부분의 β -carotene이 파괴되는 것으로 판단된다. 혈중 대사물질은 단백질, creatinine, 중성지방의 수치가 β -carotene 제제의 급여로 유의하게 낮아진 반면, glucose는 대조구에 비하여 급여수준별로 유의하게 높아졌다. 혈중 요소태질소, 총 콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤 수치는 처리구간에 차이가 없었다.
	○ 보호 베타카로틴의 개발과 이의 반추위 in vitro	반추위액을 도출된 한우에서 수거하여 in vitro 배양	보호처리 β -carotene 급여구는 대조구보다 완만한 p

		tro 안정성 조사	0, 3, 6, 9, 12시간 별로 pH를 측정하였으며, 배양 시간별로 각 처리구의 β -carotene 함량을 분석하여 그 소실률을 조사함	H하강을 나타내어 분해가 덜 일어나는 것으로 판단되며, 이는 β -carotene이 반추위내에서 대조구에 비해 분해가 덜 일어나는 것을 간접적으로 시사하였다. In vitro β -carotene(BC) 소실률은 비보호 베타카로틴제제(unprotected BC)가 급격하게 분해되는 양상을 보여주었고, 보호베타카로틴제제(protected BC)는 29.15%로 약 70%가 반추위내에서 보호되는 것으로 나타났다.
		○ 베타카로틴 적정급여수준 결정 사양시험	임신헌우 12두를 대상으로 최적의 반추위 보호 베타카로틴제제(Protected-BC)를 수준별로 급여(두당 20, 400, 600mg)하여 한우 암소의 장내 흡수 및 혈중 대사물질을 조사, 최적의 급여수준을 결정하고자 함	β -carotene농도는 베타카로틴 급여수준이 증가함에 따라 400mg 이상 급여구가 200 mg 급여구보다 유의하게 높았고, 전 처리구에서 1.5 mg/L이상으로 높게 나타나 반추위 비분해 베타카로틴이 양호한 장내 흡수상태를 나타내었다. 사료를 통한 베타카로틴 섭취수준을 달리하였을 때, 혈중 베타카로틴농도는 1.5 mg/L이상의 베타카로틴을 유지하기 위해서 필요한 베타카로틴 두당 최소 섭취량은 130mg [제품기준 : 65 g]인 것으로 추정되었다. 베타카로틴 소화율은 각 처리구에서 각각 73.7, 82.1 및 83.8%로 나타났고, 전반적으로 70% 이상으로 높게 나타났다.
		○ 농가실증시험Ⅱ : 수정란 이식 수태율 조사	경남 합천군에 있는 혈통사업장의 분만전후 번식한 우 71두를 대상으로 베타카로틴 급여구와 비급여구 그룹으로 구분하여 수정란 이식 전부터 임신여부 확	혈중 베타카로틴농도는 무급여구보다 급여구에서 각각 3.9-5.8배 유의하게 높았다. 본 결과로 미루어 개발된 반추위 비분해성 베타카로틴은 장내 흡수효율

		<p>인까지 급여, 혈중 베타카로틴 농도를 분석함</p>	<p>이 양호한 것으로 판단되었고, 교차결합기법을 이용한 베타카로틴은 경화유소재 코팅을 통한 개발 베타카로틴보다 유의하게 높게 나타나, 본 연구의 개발품보다 우수하게 평가되었다. 베타카로틴 급여군과 무급여군 그리고, 베타카로틴의 제조방식에 의하여 유의한 혈중 농도 차이를 보여주었다.</p>
	<p>○ 농가실증시험Ⅲ : 보호 베타카로틴 급여가 소 인공수정 수태율에 미치는 영향</p>	<p>번식한우 86두를 대상으로 베타카로틴 비급여구(32두), 보호베타카로틴 급여구(급여기간 6주 27두, 급여기간 10주 27두)로 구분하여 발정여부가 확인 되면 인공수정을 실시한 후 수태율을 조사</p>	<p>보호베타카로틴제제를 번식우에 60일간 급여한 결과, 번식률이 급여구에서 각각 74 및 70%로 비급여군(44%)보다 높았으며, 전체 수태율은 급여구가 대조구보다 11 ~ 15.85%의 개선효과를 나타내었다. 또한, 수태당 수정횟수가 급여구에서 2내지 2.2회로 수정횟수를 비급여구보다 0.7내지 0.9회 줄었으며 이는 수정비용 절감효과를 감소할 수 있으며 번식률개선과 수정횟수 감소로 장기적으로 한우 암소의 분만 간격과 공태기간을 단축시킬 수 있을 것이다.</p>

제 5장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1절. 연구개발의 성과

1. 논문게재 성과

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
17.12.01	Effect of charcoal:dextran stripped fetal bovine serum on in vitro development of bovine embryos	아이만	공일근	공라미, 임란칸, 초두리, 최병현, 김성우, 조규완, 진종인	Reproductive biology	17(4)	국외	SCI
17.09.01	2-Methoxystyrene improves in vitro-produced bovine embryo quality through inhibition of IKBKB	아이만, 임란칸	공일근	이경림, 송석환, 초두리, Zia Uddin, 박기훈	Theriogenology	99(1)	국외	SCI
18.05.06	Characterization of an N-Terminal Non-Core Domain of RAG1 Gene Disrupted Syrian Hamster Model Generated by CRISPR Cas9	Jinxin Miao	왕종태	Baoling Ying, Rong Li, Ann E. Tollefson, Jacqueline. Spencer, William S. M. Wold, Seok-Hwan Song, Il-Keun Kong, Karoly Toth, Yaohe Wang	Viruses	10(5)	국외	SCI
18.08.08	A combination of bovine serum albumin with insulin - transferrin - sodium selenite and/or epidermal growth factor as alternatives to fetal bovine serum in culture medium	Ayman mesalam	공일근	이경림, 임란칸, 초두리, 장시민, 송석환, 주명돈, 이재훈, 진종인	Reproduction Fertility and Development	1	국외	SCI

	improves bovine embryo quality an							
18.02.01	Lupeol supplementation improves the developmental competence of bovine embryos in vitro	임란칸, 초두리, 송석환	공일근	아이만, 장시민, Atif Ali Khan Khalil, 정은희, 김주봉, Laila Jafri, Bushra Mirza	Theriogenology	107	국외	SCI
19.06.11	In vitro production of sex preselected cattle embryos using a monoclonal antibody raised against bull sperm epitopes	초두리, 쉬론펡, 공라미	공일근	박변영, 아이만, 주명돈, Fahmida Afrin, 진종인, 임현태	Animal reproduction science	205	국외	SCI
19.06.17	Melatonin Abrogates the Anti-Developmental Effect of the AKT Inhibitor SH6 in Bovine Oocytes and Embryos	마르와, 아이만, 아메드	공일근	이드리스, 이경림	International journal of molecular sciences	20(12)	국외	SCI
19.05.01	Effect of Predator Stress on the Reproductive Performance of Female Mice after Nonsurgical Embryo Transfer	장시민, 아이만, 이경림	공일근	송석환, 쉬론펡, 임란칸, 위안유귀 Wenfa Lv.	Journal of the American Association for Laboratory Animal Science	58(3)	국외	SCI
19.05.09	Polydatin and I-CBP112 protects early bovine embryo against nicotinamide-induced mitochondrial dysfunction	위안유귀, 쉬론펡	공일근	장시민, 아이만, 이경림, 리우홍유, 주명돈, 이드리스	Theriogenology	134	국외	SCI
19.07.30	Production of cloned cats using additional complimentary cytoplasm	송석환, 이경림, 쉬론펡	공일근	주명돈, 황지윤, 오선화	Animal reproduction science	208	국외	SCI
18.12.	Silver Nanoparticles	위안유귀,	공일근	-	Oxidative		국외	SCI

12	Potentiates Cytotoxicity and Apoptotic Potential of Camptothecin in Human Cervical Cancer Cells	장시민, 황지윤			Medicine and Cellular Longevity	2018		
19.12.31	Effect of Serum and Serum Free Media on the Developmental Competence of OPU Derived Bovine IVP Embryo	최병현	공일근	박변영, 공라미, 손미주, 박찬상, 진종인	한국동물생명공학회지	2019	국내	비SCI

2. 특허 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2017	ITS 및 EGF를 포함하는 소 수정란의 체외 배양용 배지 조성물 및 이를 이용한 체외 배양 방법	경상대학교 산학협력단	대한민국	10-2017-0088639					
2019	반추위 비분해성 베타카로틴 사료첨가제	경상남도 외 1명	대한민국	10-2019-0085129					

2절. 성과 활용 계획

- 연구개발의 결과는 우량한우의 개량기술로 산업화 적용기술로 활용하고자 한다. 그 방안으로서 경남한우의 개량기술로 활용하여 경남한우의 10%까지 개량을 목표로 경상남도 축산연구소와 공동으로 추진.
- 참여기업인 경상대학교의 GAST(경남동물과학기술)에 기술이전을 실시하여 기존 OPU유래 우량한우 수정란의 생산 및 공급에 적용하여 그 효율성을 제고하여 관련 단위지자체, 단위축협 등의 개량을 위해 산업화에 활용.
- 국내 OPU유래 수정란생산 및 공급에 관련된 연구소, 기관 및 개인기업체 연구소 등에 개발된 기술들을 기술이전, 보급 및 licensing 확대하여 적정화 수준의 기술을 적용함으로써 수정란의 질적 수준을 높여 궁극적으로 전국의 우량한우개량에 기여.
- 동결수정란을 이용한 수정란이식기술을 산업화에 성공함으로써 신선란의 활용 시 공간적, 시간적 한계에서 벗어나 전국을 상대로 개량기술을 적용할 수 있을 것이다. 그리하여 개량효율을 극대화시켜 지속 가능하고 고부가가치를 창출할 수 있는 한우산업으로 발전하는데 기여. 동결란을 이용한 수정란이식의 산업화 위해서는 수정란 질적수준, 시술자 교육 및 농가의 인식전환에 의한 시너지효과위한 정부차원의 정책적 지원이 필요한 것으로 판단됨.
- 한우사육농가에 우수한 공란우를 활용한 수정란의 대량생산을 위해 3 wave 난포파동을 이용한 OPU난자채란기술의 적용이 매우 필요할 것으로 판단됨.
- 수정란이식 전/후 사양관리체계 가이드라인 제시 및 대리모 선발위한 혈중지표물질의 결정 및 참고치의 설정은 대리모 선발의 객관적인 기준이 될 수 있을 것임. 또한 농가의 무분별한 관행사육으로 고가로 시술된 수정란이 사멸되는 것을 줄일 수 있음.
- 대리모의 수정란이식 전후 베타카로틴의 적용기술 및 신제품 개발은 번식우의 사양관리의 농가수준의 체계화가 가능하고, 경남 도 사업에 참여시군의 수정란이식 농가에 우선적으로 관리기술을 전파할 계획.
- 한우 임신우 전용 보호 베타카로틴을 대량생산하여 산업화에 활용.

제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 해당사항 없음

제 7장 연구시설·장비 현황

- 해당사항 없으며 모두 기존 장비로 연구하였음

제 8장 연구실 안전관리 이행실적

1절. 실험실 안전점검 실시

「연구실 안전환경 조성에 관한 법률」에 의거 일상점검, 정기점검, 특별안전점검, 정밀안전진단을 실시

1. 일상점검

연구개발활동 전 연구 개발활동에 사용되는 실험 약품 및 장비의 이상 유무 점검

- 기간: 년 중
- 실시자: 연구 활동 종사자
- 내용: 실험실별 특성에 맞는 점검표 작성 후 점검 실시

2. 정기점검

실험실 안전점검 체계에 따라 매년 정기점검실시

- 기간: 매월 첫 주 수요일
- 실시자: 연구실 책임자 및 담당자
- 내용: 실험실 안전점검 프로그램을 사용하여 분야별 항목 점검

3. 특별안전점검

폭발사고, 화재사고 등 연구 활동 종사자의 안전에 치명적인 위협을 야기할 가능성이 있을 것으로 예상되는 경우에 연구실 책임자의 지시에 의해 실시

- 기간: 년중 필요시
- 실시자: 연구실 책임자
- 내용: 위험요인별 점검

4. 정밀안전진단

정기점검 실시 후 도출된 위해요인에 대하여 외부 전문기관에 진단을 의뢰하여 위해요인의 개선방향 및 안전관리방안 수립

- 기간: 2017년 5월~ (매년)
- 실시자: 외부전문 진단기관
- 내용: 정기점검 후 선정된 중점 점검항목 및 연안법에 규정된 점검항목 진단

제 9장 참고문헌

1. Aréchiga, C. F., C. R. Staples, L. R. McDowell, and P. J. Hansen. 1998. Effects of timed insemination and supplemental β -carotene on reproduction and milk yield of dairy cows under heat stress. *J. Dairy Sci.* 81:390-402.
2. Armstrong DT, Irvine BJ, Earl CR, McLean D and Seamark RF. 1994. Gonadotrophin stimulation regimens for follicular aspiration and in vitro embryo production from calf oocytes. *Theriogenology* 42: 1227-36.
3. Ashes, J. R., Burley, R. W., Sidhu, G. S., Sleigh, R. W., 1984. Effect of particle size and lipid composition of bovine blood high density lipoprotein on its function as a carrier of beta-carotene. *Biochim. Biophys. Acta* 797:171-177.
4. Barker JSF, Tan SG, Selvaraj OS and Mukherjee TK. 1997. Genetic variation within and relationships among populations of Asian water buffalo (*Bubalus bualis*). *Anim. Genet.* 28: 1-13.
5. Bjornstad G, Nilsen NO and Roed KH. 2003. Genetic relationship between Mongolian and Norwegian horses? *Anim. Genet.* 34: 55-8.
6. Blott SC, Williams JL and Haley CS. 1999. Discriminating among cattle breeds using genetic markers. *Heredity* 82: 613-9.
7. Bols PEJ, Vandenheede JMM, Van Soom A and de Kruif A. 1995. Transvaginal ovum pick up (OPU) in the cow: a new disposable needle guidance system. *Theriogenology* 43: 677-87.
8. Bols PEJ, Ysebaert MT, Van Soom A and de Kruif A. 1997. Effect of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity of bovine compact cumulus oocyte complexes. *Theriogenology* 47: 1221-36.
9. Boni R, Roviello S and Zicarelli L. 1996. Repeated ovum pick up in Italian mediterranean buffalo cows. *Theriogenology* 46: 899-909.
10. Bruck I, Synnestvedt B and Greve T. 1997. Repeated transvaginal oocyte aspiration in unstimulated and FSH-treated mares. *Theriogenology* 47: 1157-67.
11. Callesen H, Greve T and Christensen F. 1987. Ultrasonically guided aspiration of bovine follicular oocytes. *Theriogenology* 27: 217.
12. Can, R., Yilmaz, K., Gul, Y. 1986. Une recherche sur les quantites de beta-carotene et de vitamine A plasmatiques chez les vaches infertiles. *Turk J. Vet. Anim. Sci.* D1 10:18-23
13. Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN and Caskey CT. 1988. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res.* 16: 11141-56.
14. Chew, B. P., Wong, T. S., Michal, J. J., 1993. Uptake of orally administered beta-carotene by blood plasma, leukocytes, and lipoproteins in calves. *J. Anim. Sci.*

- 71:730–739.
15. Chrysochou P, Chryssochoidis G and Kehagia O. 2009. Traceability information carriers. The technology backgrounds and consumers' perceptions of the technological solutions. *Appetite* 53: 322–31.
 16. DeMayo FJ, Rawlins RG and Dokelow WR, 1985. Xenogenous and in vitro fertilization of frozen thawed primate oocytes and blastomere separation of embryos. *Fertil. Steril.* 43: 295–300.
 17. Fry RC, Simpson TL and Squires TJ. 1998. Ultrasonically guided transvaginal oocyte recovery from calves treated with or without GnRH. *Theriogenology* 49: 1077–82.
 18. Galli C, Crotti G, Notari C, Turini P, Duchi R and Lazzari G. 2001. Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology* 55(6): 1341–57.
 19. Garcia A and Salaheddine M. 1998. Effects of repeated ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and subsequent follicular development. *Theriogenology* 50: 575–85.
 20. Guyader Joly C, Ponchon S, Thuard JM, Durand M, Nibart M, Marquant-Le Guienne B and Humblot P. 1997. Effect of superovulation on repeated ultrasound guided oocyte collection and in vitro embryo production in pregnant heifers. *Theriogenology* 47: 157.
 21. Haliloglu, S., Baspinar N., Serpek, B., Erdem, H., Bulut, Z., 2002. Vitamin A and beta-carotene levels in plasma, corpus luteum and follicular fluid of cyclic and pregnant cattle. *Reprod. Domst. Anim.* 37:96–99.
 22. Hino, T., N. Andoh and H. Ohgi. 1993. Effects of β -carotene and α -tocopherol on rumen bacteria in the utilization of long-chain fatty acids and cellulose. *J. Dairy Sci.* 76:600–605.
 23. Hochi S, Fujimoto T and Oguri N. 1995. Viability of immature horse oocytes cryopreserved by vitrification. *Theriogenology* 43: 236.
 24. Hotamisligil S, Toner M and Power R. 1996. change in membrane integrity, cytoskeletal structure and developmental potential of murine oocytes after vitrification in ethylene glycol. *Biol. Reprod.* 55: 161–8.
 25. Hurley, W.L., and R.M. Doane. 1989. Recent developments in the roles of vitamins and minerals in reproduction. *J. Dairy Sci.* 72:784–804.
 26. Immig, I. 2009. Beta-carotene and cow reproductive performance. *AllAboutFeed* 17(5):28–31.
 27. Irvine B, Armstrong DT, Earl C, McLean D and Seemark RF. 1993. Follicle development and oocyte recovery from calves with repeated gonadotropin stimulation and follicular aspiration. *Theriogenology* 39: 237.
 28. Kasai M, Iritani A and Chang MC. 1979. Fertilization in vitro of rat ovarian oocytes after freezing and thawing. *Biol. Reprod.* 21: 839 - 44.
 29. Korean feeding standard for Hanwoo, 2007. National Institute of Animal Science, RDA, Korea.
 30. Lane M and Gardner DK. 2001. Vitrification of mouse oocytes using a nylon loop. *Mol.*

- Reprod. Dev. 58: 342-7.
31. Liang XW, Lu YQ, Chen MT, Zhang XF, Lu SS, Zhang M, Pang CY, Huang FX and Lu KH. 2008. In vitro embryo production in buffalo (*Bubalus bubalis*) using sexed sperm and oocytes from ovum pick up. *Theriogenology* 69(7): 822-6.
 32. Martino A, Songsasen N and Leibo SP. 1996. Development into blastocysts of bovine oocytes by ultra-rapid cooling. *Biol. Reprod.* 54: 1059-69.
 33. Mora, O., J. L. Romano, E. González, F. J. Ruiz, R. Gómez, and A. Shimada. 2001. Presence of fed β -carotene in digesta, excreta, blood and hepatic and adipose tissues of Holstein steers. *Can. J. Anim. Sci.* 81:133-139.
 34. Neglia G, Gasparrini B, Caracciolo di Brienza V, Di Palo R, Campanile G and Antonio Presicce G. 2003. Bovine and buffalo in vitro embryo production using oocytes derived from abattoir ovaries or collected by transvaginal follicle aspiration. *Theriogenology* 59: 1123 - 30.
 35. Nozière, P., B. Graulet, A. Lucas, B. Martin, P. Grolier, M. Doreau. 2006. Carotenoids for ruminants: From forages to dairy products. *Anim. Feed Sci. Technol.* 131:418-450.
 36. Puls, R., 1994. Serum vitamin levels. In: *Vitamin Levels in Animal Health*, edited by R. PULS, Canada, Sherpa International Publishing House, pp. 11-33.
 37. Quinn P. Kerin J, Stone B and Wilson L. 1986. successful cryopreservation of human oocytes In: 42nd Ann Mtg Am Fertil Cos and 18th Ann Mtg Candian Fertil Androl Soc. pp. 72 (Abstract).
 38. Rall WF and Fahy GM. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ by vitrification. *Nature* 313: 573-5.
 39. Rubinsky B, Arav A and Devries AL. 1992. The cryoprotective effect of antifreeze glycopeptides from Antarctic fishes. *Cryobiology* 29: 69 - 79.
 40. SAS/STAT®, 2011. User's Guide, Version 9.3, SAS Inst., Inc., Cary, NC.
 41. Sathanathan AH, Ng SC, Trounson AC, Bongso A, Ratnam SS and Ho J. 1988. The effect of ultrarapid freezing on meiotic spindles of mouse oocytes and embryos. *Gamete Res.* 21: 385 - 401.
 42. Schehellander K, Peli J, Schmoll F and Brem G. 1994. Effects of cryopreservation and carbohydrates on freezing of matured and unmatured bovine oocytes. *Theriogenology* 23: 909-15.
 43. Schenk JL, Suh TK, Cran DG and Seidel GE Jr. 1999. Cryopreservation of flow-sorted bovine spermatozoa. *Theriogenology* 52(8): 1375-91.
 44. Schweigert, F. J., 2003. Research note: changes in the concentration of beta-carotene, alpha-tocopherol and retinol in the bovine corpus luteum during the ovarian cycle. *Arch Tierernahr* 57:307-310.
 45. Schweigert, F. J., Engalbert, F., Mothes, R., Hurtienne, A., Immig, I., 2007. Cooperative European study for the validation of a novel cow-side β -carotene assay in serum and blood. In: Program of 13th International Conference on Production Disease in Farm Animals, Leipzig, Germany (abstract 162).

46. Schweigert, F. J., Lutterbach, A., Rambeck, W. A., Zucker, H., 1986. Vitamin A- and beta-carotene concentrations in bovine follicular fluid in relationship to follicle size. *Zentralbl Veterinarmed A* 33:360-364.
47. Seidel GE Jr. 1999. Sexing mammalian spermatozoa and embryos-state of the art. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 54: 477-87.
48. Seidel GE Jr. 2014. Update on sexed semen technology in cattle. *Animal* 8 (Suppl 1): 160-4.
49. Shete, V., L. Quadro. 2013. Mammalian metabolism of β -carotene: Gaps in knowledge. *Nutrients* 5:4849-4868.
50. Suh TK, Schenk JL and Seidel GE Jr. 2005. High pressure flow cytometric sorting damages sperm. *Theriogenology* 64(5): 1035-48.
51. Tekpetey, F. R., W. M. Palmer, and J. R. Ingalls, 1987. Seasonal variation in serum β -carotene and vitamin A and their association with postpartum reproductive performance of Holstein cows. *67:491-500.*
52. Tervit HR, McMillan WH, McGowan LT, Smith JF, Hall DRH and Donnison MJ. 1997. Effect of juvenile calf age on follicular dynamics and in vitro embryo production. *Theriogenology* 47: 300.
53. Todorow SJ, Siebzehruebl ER, Koch R, Wildt L and Lang N. 1989. Comparative results on survival of human and animal eggs using different cryoprotectants and freeze - thawing regimens. I. Mouse and hamster. *Hum. Reprod.* 4: 805 - 11.
54. Trounson A. 1986. Preservation of human eggs and embryos. *Fertil. Steril.* 46: 1 - 12.
55. Tubman LM, Brink Z, Suh TK and Seidel GE Jr. 2004. Characteristics of calves produced with sperm sexed by flow cytometry/cell sorting. *J. Anim. Sci.* 82(4): 1029-36.
56. Vajta G, Booth PJ, Holm P, Grave T and Callesen H. 1997. Successful vitrification of early stage bovine in vitro produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. *Cryo-letters* 18: 191-5.
57. van Wagtendonk-de Leeuw A.M. 2006. Ovum pick up and in vitro production in the bovine after use in several generations: A 2005 status. *Theriogenology* 65: 914-25.
58. Vincent C, Garnier V, Heyman Y and Renard JP. 1989. Solvent effects on cytoskeletal organization and in-vivo survival after freezing of rabbit oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 87, 809 - 20.
59. Whittingham DG, Leibo SP and Mazur P. 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C. *Science* 178: 411-4.
60. Wing, J. M., 1969. Effect of source and season on apparent digestibility of carotene in forage by cattle. *J. Dairy Sci.* 52(4):479-483.
61. 박성재, 류일선, 이동원, 연성흙, 서국현, 허태영, 백광수, 안병석, 손동수, 백광수. 2001, Comparison of the Ultrasound-Guided vs. Hand-Operated Vacuum Pump Transvaginal Ovum Pick-up in Holstein. *Korean J. Emb. Trans.* 16: 145-52.
62. 박성재, 양보석, 임기순, 성환후, 양병철, 장원경, 정일정, 정기화, 심보웅, 양별철. 2000, Effect of Ovum Pick-up Frequency on In Vitro Production of Embryos in Hanwoo

- Cattle. Korean J. Emb. Trans. 15: 1-8.
63. 박희성, 이지삼, 진동인, 박준규, 홍승표, 이명열, 정장용. 2001. Practical Applications of DNA Marker-Assisted Selection and OPU-Derived IVF Embryo Transfer for the Production of High Quality Meat in Hanwoo II. Production of IVF Embryos Derived Transvaginal Ovum Pick-up from DNA Marker-Proved Hanwoo. Korean J. Emb. Trans. 16: 193-201.
 64. 손우진, 강태영, 조성근, 심보웅, 최민철, 최상용, 박충생, 이효종. 1998. Study on In Vitro Bovine Embryo Production with Follicular Oocytes Obtained via Ultrasound-guided Ovum Pick-up (OPU) and Slaughterhouse-derived (SHD) Ovary Aspiration in Korean Native Cows. Korean J. Emb. Trans. 13: 107-15.
 65. 윤기영, 이병천, 황우석, 김현일, 노상호, 이강남. 1997. Transvaginal ultrasound-guided ovum pick-up in cattle. 대한수의학회지. 37: 917-24.
 66. 이병천, 윤기영, 김현일, 노상호, 이강남, 황우석. 1997. Clinics: Transvaginal ultrasound-guided ovum pick-up in cattle: 1. Effects of estrus cycle, season and bST treatment on ovum pick-up in cattle. 대한수의학회지. 37: 917-9.
 67. 이병천. 1998. Transvaginal Ultrasound-guided Ovum Pick-up(OPU) in Cattle 2. First OPU-IVF Derived Calves Born from Pregnant Cow in Korea. Korean J. Emb. Trans. 13: 77-86.
 68. 진종인, 권태현, 최병현, 김성수, 조현태, 공일근. 2010. Effect of OPU (Ovum Pick-Up) Duration on the Rate of Collected Ova and In Vitro Produced Blastocyst Formation. Korean J. Emb. Trans. 25: 15-20.
 69. 진종인, 권태현, 최병현, 김성수, 조현태, 방재일, 김삼철, 조규완, 이정규, 공일근. 2011. Effect of Early Pregnant Heifer as Donor on the Ovum Pick-Up Derived Oocyte Aspiration and Embryo Production. Korean J. Emb. Trans. 26: 19-25.
 70. 진종인, 홍승표, 정장용, 이지삼, 박희성. 2000. Study on Ovum Pick-up (OPU) with Finger-Sensibility using Oocyte Recovery in Holstein Heifers. Korean J. Emb. Trans. 15: 279-86.
 71. 최민철, 조성근, 강태영, 박준규, 손우진, 이효종. 1997. Development of basic techniques for ultrasound-guided follicular aspiration; anesthetic methods and development of a disposable simplified needle guidance system for ovum pick-up. Korean J. Emb. Trans. 12: 211-8.
 72. 황우석, 신태영, 노상호, 박종임, 이병천. 1998. Clinics : Induction of twinning in Korean native cattle by transfer of nuclear transplanted embryos: 2. Nuclear transfer using donor embryos originated from ovum pick-up (OPU) and activated recipient cytoplasts. 대한수의학회. 16: 145-52.

<뒷면지>

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.