

발 간 등 록 번 호

11-1543000-000984-01

**산양에 있어서 생식세포의 포괄적 이용에 의한  
규모화 인공수정, 수정란이식 및  
핵이식 수정란 생산기술 확립**

Establishment of a large scale AI, ET and production techniques  
of nuclear transferred embryos  
by comprehensive using of germ cells in goat

농업회사법인  
**바이오컬처(주)**

농 립 축 산 식 품 부



# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “산양에 있어서 생식세포의 포괄적 이용에 의한 규모화 인공수정, 수정란이식 및 핵이식 수정란 생산기술 확립( Establishment of a large scale AI, ET and production techniques of nuclear transferred embryos by comprehensive use of germ cells in goat )” 과제의 최종 보고서로 제출 합니다.

2015년 8월 10일

주관연구기관명 : 농업회사법인 바이오컬쳐(주)

주관연구책임자 : 이 장 회

세부연구책임자 : 이 장 회

연 구 원 : 백 순 화 (백석대학교)

연 구 원 : 최 순 옥 (바이오컬쳐(주))

연 구 원 : 정 곁 (바이오컬쳐(주))

연 구 원 : 이 주 형 (바이오컬쳐(주))

연 구 원 : 박 성 재 (바이오컬쳐(주))

연 구 원 : 정 푸 른(서울호서직업전문학교)

연 구 원 : 주 찬 양(서울호서직업전문학교)





## 요 약 문

본 과제는 “산양에 있어서 생식세포의 포괄적 이용에 의한 규모화 인공수정, 수정란이식 및 핵이식 수정란 생산기술 확립”에 관한 연구이다. 먼저 우리나라 지역별 사육농가수와 사육두수현황을 살펴보면 전라남도가 134,872두로 전체 24%를 차지하고 있으며 경상남도가 89,808두로 16.0%로 남부지역의 사육두수가 전체 사육두수의 40%를 차지하고 있다. 사육농가수로는 전라남도의 사육호수가 12,422호로 가장 많으며, 다음으로는 경남이며, 유산양의 사육두수는 전라북도가 28,345두로 가장 많고, 충남 지역은 시장 접근성에서 가장 유리한 실정에 있다.

유산양은 본질적으로 계절번식동물이며, 발정지속 시간이 다른 동물과 비교하여 매우 짧고, 군집 형태로 사육하는 경향이 많아서 발정, 임신 및 분만을 인위적으로 조절하기가 쉽지 않은 실정이다. 재래산양의 개량을 위한 수단으로 인공수정과 수정란이식을 위해서는 개체 관리에 의한 발정과 다배란을 유기하여 적기에 인공수정 및 수정란을 이식하는 것이 중요하다

따라서 본 연구는 우리나라의 계절에 알맞은 산양의 발정동기화 및 다배란 유기 기술을 개발하고, 인공수정과 수정란이식기술을 확립하며, 우수한 종양의 체세포로부터 공여 핵을 확보하여 복제 수정란 생산과 이식기술을 개발하고자 아래와 같은 연구를 수행하였다.

- 1) 산양 정액의 동결보존과 발정동기화 및 예정시각 인공수정기술 개발
- 2) 산양의 난포란 채란과 체외배양
- 3) 다배란 유기와 수정란이식기술 개발
- 4) 체세포로부터 공여 세포 핵 확보 및 동결보존
- 5) 난포란의 체외배양과 복제 수정란 생산
- 6) 복제 수정란의 이식기술 개발

본 연구에서 다음과 같은 결과를 얻었다.

- 1) 동해보호제의 종류에 따른 내동성(활력)은 동물성인 egg yolk가 75.5%로 가장 높았으며, 식물성의 soybean milk도 75.0%의 높은 활력을 나타내었다. Dried persimmon(곶감)을 사용하였을 경우에는 가장 낮은 45.0%의 활력을 나타내었다. 무플린(Mouflon) 정자의 동결 성적은 전반적으로 산양보다 매우 낮은 경향을 나타내었다.
- 2) 산양에 있어서 발정확인율을 개선하기 위하여 시정모를 이용한 결과 육안적 관찰(대조구)에 비하여 발정확인율이 33.1% 증가하여 90.6%의 발정확인율을 나타내었다.
- 3) Ring-CIDR에 의한 비번식계절에서의 발정동기화에 의한 Non-return rate(%)은 50.0%로 번식계절의 수태율보다 낮았다.
- 4) 산양의 난포발달은 번식계절 중(Group II)이 번식계절 도래 시(Group I)보다 호르몬 처리에 대한 반응이 다소 높게 나타났으며( $8.6 \pm 3.4$  vs  $8.3 \pm 3.2$ ), 난포발달에 영향을 미치는 호르몬치리로

PG600(Group II)과 FSH(Group III)처리에서는 PG600 처리가 난포발달 및 회수율이 다소 높게 나타났다( $p < 0.05$ ). 이는 계절번식 기간이 다소 난포발달에 효과적이었으나 난소반응이 비슷한 수준으로 보아 우리나라 재래산양의 계절번식성은 희박하다고 할 수 있다.

- 5) 체외성숙율은 PMSG+hCG 첨가구에서 87.5%의 성숙율(CEI = 2.28)로 가장 높게 나타났다. 산양 난포란의 체외성숙율에서는 PMSG가 난포란의 체외성숙에 가장 유효하게 작용함을 알 수 있었다.
- 6) 체외 수정율은 성숙 시 PMSG+hCG를 첨가하였을 때 89.7%로 가장 높은 수정율을 나타냈으며, 체외 성숙율과 수정율간에는 정의 상관관계가 나타났다. 한편 정자 농도별 체외 발생율은  $3.0 \times 10^6$  cell/ml 로 수정하였을 때가 가장 높은 69.2%의 발생율을 나타내었다.
- 7) 재래 산양에 있어서 정액 성상은 번식계절이 비번식계절 보다 일반적으로 양호하였으나 정액 성상 중 정액량은 비번식계절과 번식계절간의 유의적인 차이( $p < 0.05$ )를 나타내었으나 농도와 활력에서는 차이가 나타나지 않았다.
- 8) 예정시각 인공수정(3 ~ 6두 그룹) 후 채란되지 않은 처리별 각 3두에서 Group I과 Group II에서 각각 3두 및 1두에서 분만이 이루어졌다. 전체 9두 중 4두가 분만되어 44.4%의 분만율을 나타내었다. 분만된 어미들은 분만 예정일(수정 후 150일)  $\pm$  2일 이내에 분만이 이루어졌으며(Fig. 16), 평균 임신기간은 151.6일( $n=13$ )이었다.
- 9) 체내 수정란과 체외 수정란을 비외과적으로 이식한 결과 체내수정란 이식에서는 3두 중 1두가 쌍자를 분만하였으며, 체외수정란 이식에서는 4두 중 1두가 1마리를 분만하였다. 본 연구에서 무푸른 정액으로 인공수정(또는 교배) 및 수정된 수정란으로 태어난 자양은 포유 중에 폐사하는 경향이 많았다.
- 10) Group 별 32, 33 및 38개의 난포란을 성숙시킨 후 제핵하고 체세포 핵을 이식하였을 때 융합율은 평균 39.6%였다(36.4 ~ 50.0%). 4-cell 이상으로 발생된 복제수정란은 모든 처리에서 총 8개를 생산하였으며 외과적, 비외과적으로 각각 복제수정란을 2개씩 이식하였으나 산자 생산에는 이르지 못하였다.
- 11) 특허 출원(등록) 및 논문 발표 : 특허출원 1, 특허등록 6건, 논문게재 2, 학술발표 10편을 달성하였다.

상기 결과에서 우수 산양의 유전자원으로써의 공여 핵을 이용한 복제수정란 생산에 성공하였다. 다만 다양한 이식기술을 시도하였으나 분만에 성공하지는 못하였다. 이와 같은 결과는 앞으로 타 축종에서의 우량 가축의 복제기술 적용에 의한 개량 기반 구축과 야생동물(산양)의 복원 등에도 크게 기여될 것으로 사료되었다.

## SUMMARY

This study is "Techniques establishment of a large scale AI, ET and production of nuclear transferred embryos by comprehensive using of germ cells in goat". On the this goal, goat breeding was promoted as a new source of income for livestock farmers in Korea, This phenomenon is caused by the fact that the output of meat from domestic goat farmers is lower than the output from foreign breeders. Therefore, it is necessary to modify breeding techniques to increase the domestic output of high quality goat for meat production. In particular, there is an urgent need to develop the techniques of artificial insemination(AI) and embryo transfer(ET) and to make efficient use of high quality species. But it is still difficult to apply the techniques developed in other countries because the goat is a seasonal breeding animal. Thus, in Korea it is necessary to develop a technique that is appropriate to the climate of this country.

This study is undertaken in order to develop an estrus and ovulation synchronization technique that is suitable to the Korean climate, to collect cryo-preserve semen from a high quality species for large scale AI, to develop technique for culture of oocytes *in vitro*. and then to use in the production and transfer of cloned embryo of goat controlled reproductively, following studies were conducted.

- 1) Development of technologies for fixed-time artificial insemination(AI) and embryo transfer(ET) from estrus and ovulation synchronization
- 2) Development of technologies for superovulation to produce many of oocyte
- 3) Development of technologies for collection and in vitro culture of oocytes
- 4) Development of efficient culture system *In vitro*, technologies for collection and cryo-preservation of genetic resources
- 5) Development of technologies for production and transfer of cloned embryo

### **Results are as a following.**

- 1) Kidding rate of fixed-time artificial insemination(AI) was 44.4%, respectively.
- 2) When the oocytes were matured for 36hrs in the medium containing PMSG + hCG hormone maturation rate was 87.5%, respectively.
- 3) When the concentration of sperm for IVF were  $3.0 \times 10^6$  cell/ml, the highest cleavage rate was 69.2%, respectively.
- 3) Nuclear and microtubule remodeling and in vitro development of nuclear transferred oocytes with ear cell of the goat and were developed to 4-cell stage(42.8%)
- 4) Cloned 4-cells were transferred to the flower goat, the parturation was not succeeded.
- 5) Registration of a patent and paper presentation : 6 and 10

The results indicate that allow continuous proliferation of ear cells *in vitro* established the foundation to basic biology of cloned embryo and makes possible application to the regenerative medicine in a broad sence.

## CONTENTS

<b>Chapter 1. Outline of study</b> .....	9
Section 1. Object of research and development .....	9
Section 2. Necessity of research and development .....	10
Section 3. Contents and range of research .....	11
<b>Chapter 2. Current domestic and outside technical status</b> .....	14
Section 1. Domestic case .....	14
Section 2. Outside case .....	19
<b>Chapter 3. Results and contents of research and development</b> .....	22
Section 1. Maintain of excellent goat(sire) and antler cell collection.....	22
Section 2. Establishment of technique of superovulation and <i>in vitro</i> culture of oocytes for production of cloned embryo.....	32
Section 3. Production of cloned embryo derived <i>in vitro</i> cultured oocytes.....	38
Section 4. Establishment of transfer technique of cloned embryo .....	40
<b>Chapter 4. Attainment of research purpose and contribution     to related research field</b> .....	48
Section 1. Attainment of research purpose.....	48
Section 2. Application plan of obtained research results.....	51
<b>Chapter 5. Application plan of obtained research results</b> .....	55
Section 1. Results of research .....	55
Section 2. Contribution to related research field .....	62
<b>Chapter 6. Foreign information collected during research</b> .....	67
<b>Chapter 7. References</b> .....	68
<b>Appendix</b>	
Appendix 1. Annual experimental plan and contents.....	74
Appendix 2. Registration of a patent .....	78
Appendix 3. Abstracts and application report of obtained research results.....	84



# 목 차

<b>제 1 장</b>	<b>연구개발과제의 개요</b> .....	11
제 1 절	연구개발의 목표 .....	11
제 2 절	연구개발의 필요성 .....	13
제 3 절	연구 개발의 내용과 범위 .....	13
	1. 연차별 연구개발의 목표 및 내용.....	13
	2. 세부(협동)과제별 연구 내용과 범위.....	15
<b>제 2 장</b>	<b>국내외 기술개발 현황</b> .....	16
제 1 절	국내 현황 .....	16
제 2 절	국외 현황 .....	21
<b>제 3 장</b>	<b>연구개발 수행 내용 및 결과</b> .....	24
제 1 절	우수 산양의 확보 및 체세포 수집 .....	24
	1. 생식세포 동결 기술 확립 .....	24
	2. 수정란 생산을 위한 발정동기화 및 다배란 처리.....	27
	3. 난포란 체란과 체외 성숙 및 체외 수정.....	29
	4. 통계 처리.....	34
제 2 절	품종간 교배조합에 의한 잡종 생산.....	34
	1. 종간 교배조합에 의한 수정란의 발생 능 조사 .....	34
	2. 인공수정에 의한 교배조합 수정란 이식 결과 .....	37
제 3 절	산양 수정란 이식 기술의 확립.....	40
	1. 산양의 수정란 이식 기술.....	40
	2. 교배조합 수정란의 이식 결과.....	41
제 4 절	핵이식 수정란(복제)의 생산 및 이식 기술 확립.....	42
	1. 재래산양 기반 난자로부터 핵이식 수정란생산 기술 확립 .....	42
	2. 산양의 핵이식 수정란이식 기술의 확립 .....	45
<b>제 4 장</b>	<b>목표달성도 및 관련 분야에의 기여도</b> .....	50
제 1 절	연도별 연구개발 목표의 달성도.....	50
제 2 절	관련분야의 기술발전예의 기여도.....	53
	1. 논문 발표(2편).....	53
	2. 산업재산권(5건).....	53
	3. 학술발표(10편).....	54
	4. 박람회(전시회) 출전(2회).....	54
	5. 박람회(전시회) 참관(1회).....	55

<b>제 5 장</b>	<b>연구개발성과 및 성과활용계획</b>	57
제 1 절	연구개발 성과	57
1.	연구성과 목표 대비 성과(달성)	57
2.	연구 성과 실적	58
3.	홍보 실적(박람회 또는 전시회 참가)	63
제 2 절	연구 성과 활용 계획	64
1.	연구 성과 활용 목표 및 실적 대비	64
2.	연구 성과 활용 계획	65
3.	제품 및 시장 분석	66
4.	3P(특허, 논문, 제품) 분석을 통한 연구 추진 계획	68
<b>제 6 장</b>	<b>연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보</b>	69
제 1 절	박람회 참가	69
<b>제 7 장</b>	<b>참고문헌</b>	70
<b>부록</b>		76
1.	연도별 실험 추진 내역	76
2.	학술 발표	80
3.	특허등록	86
<b>별첨</b>		87
1.	연구개발보고서 초록	87
2.	자체평가의견서	88
3.	연구성과활용결과 보고서	91



# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 개요 및 목표

### 1. 개발 대상 기술(또는 제품)의 개요

국내 지역에서 특화 가능한 동물자원인 산양(염소)으로부터 **계량 및 증식기반**을 마련코자 함. 우수 산양으로부터 채취된 정액을 동결보존하고 필요시 피임 및 발정유도장치(동물용 약물방출링)를 이용하여 예정된 시간에 인공수정 및 수정란이식으로 지역 내 산양(유산양포함)의 번식효율 증진과 **계량(또는 품종 유지)**을 촉진코자 하며, **핵이식기술 확립**으로 새로운 품종 도입 수단으로 이용하며 더 나아가 신약생산을 위한 **형질전환동물생산** 기반을 확고히 구축코자 하였음.

### 2. 연구개발의 목표

- 산양의 생산성 증대를 위한 규모화 인공수정 및 수정란이식기술 확립
- 산양 및 유산양에서의 규모화 인공수정 기술 기반 확립
- 제대 산양을 근간으로 하는 종(種) 간 및 품종 간 잡종 생산
- 핵이식 수정란 생산기술 확립으로 바이오신약 생산 기반 구축
- 산양 및 유산양에서의 수정란이식 기술 확립
- 산양 및 유산양에서의 핵이식 기술 확립



<임간 방목과 생명공학기술 접목에 의한 산양 생산성 증대 및 계량 기술 개발>

## 제 2 절 연구개발의 필요성

가. 바이오신약장기 생산을 위한 반추동물의 실험동물로 재래 산양이 산업적으로 유리  
나. 국내 재래산양(염소) 자원의 한정적 이용성 확대 필요(육용, 약용, 신약생산용)  
다. 충남에 집중되어 있는 동물자원관련 연구기반 및 관련 대학 등의 인프라를 적극 활용

- 충남농업기술원, 국립축산과학원, 충남가축위생시험장 및 충남대, 천안연암대, 단국대, 공주대, 건양대-동물자원센터 등

라. 국내 산양 농가의 생산성 증대로 수입 물량 저지에 따른 위기 극복

- 외국으로부터 수입되는 산양고기와의 차별화 전략 필요
- 한미, 유럽 FTA 협상 결과에 따른 국내 축산 산업의 다양화 모색 필요

마. 산양 인공수정, 수정란 이식 및 핵이식의 산업화 기반 구축 필요

- 국내 산양 인공수정은 일부 단체 및 조합에서 제한적인 이용, 이를 확대하여 새로운 개량 기반 개척 필요.
- 규모화 인공수정을 통한 번식기술 확립과 생산성 증대 필요
- 수정란이식(ET) 및 핵이식(NT)기반 마련을 통한 개량 가속화 필요
- 신기술 번식기술 확립으로 바이오신약 생산기반 구축 필요

바. 농가 소득 향상에 기여

- 우수 및 개량된 산양(염소) 보유로 농가 소득 확대 가능성 높음.
- 노동 인력 창출 기여(인공수정업/수정란이식업) : 특히 유산양 산업에 적용 필요
- 지역 연계 전문 인력 고용 창출 및 시너지효과로 고부가가치 직종으로 부상

사. 염소고기 수입 억제 필요

- 국내 염소고기 생산량은 약 4,800톤으로 국내 전체 소비량의 54% 수준임.  
\* 전체 소비량의 44%인 3,500톤 규모가 수입되고 있음

### 제 3 절 연구 개발의 내용과 범위

#### 1. 1년차 연구개발의 내용과 범위

구분	연도	연구개발의 목표 및 주요 연구 내용
1년차	2012.8~ 2013.8	<ul style="list-style-type: none"> <li>□ 산양 및 유산양에서의 규모화 인공수정 기술 기반 확립               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 생식세포(정자 및 난자) 동결기술 확립                   <ul style="list-style-type: none"> <li>- 동해보호제(soybean) 대체로 감염 및 오염 억제                       <ul style="list-style-type: none"> <li>: soybin 부유액 등의 동해보호제 3종 처리 비교</li> </ul> </li> <li>- 활력정자 분리 포장 및 closed pulled straw 적용 수정란 생산                       <ul style="list-style-type: none"> <li>: 동결 용해 후 정자 생존성 70% 이상 확립</li> </ul> </li> </ul> </li> <li>○ 발정동기화에 의한 규모화 번식기술 확립                   <ul style="list-style-type: none"> <li>- Fixed time AI 기술 확립(재래산양15, 유산양5, 무플런5두 이상)</li> <li>- 인공수정 수태율 60% 이상 도달 (발정동기화 3처리 방법으로 수행 수태율 향상 기술 확립)</li> </ul> </li> <li>○ 중간 교배조합(인공수정)에 의한 중간 잡종 생산 가능성 검증                   <ul style="list-style-type: none"> <li>- 산양♀X유산양♂, 산양♀X누비양♂, 산양♀X무플런♂</li> <li>- 산양 과배란 처리 회수 난포란을 이용 체외수정을 조사</li> <li>- 품종별 체외수정란의 발생능 조사</li> <li>- 인공수정으로 교배시험 수행(각 처리별 암컷5)</li> <li>- 다배란 처리 인공수정 후 신선 수정란의 회수율 개선(50% 이상)</li> </ul> </li> <li>○ 비번식계절에서의 인위적 수태 기술 확립(유산양 우5, ♂1)                   <ul style="list-style-type: none"> <li>- Melatonin, Progesterone의 체내 삼입 발정 유도 기술 확립</li> <li>- 발정탐지율 개선 연구(육안적 발정 관찰 vs 시정모 운용)</li> </ul> </li> </ul> </li> </ul>

## 2. 2년차 연구개발의 내용과 범위

구분	연도	연구개발의 목표 및 주요 연구 내용
2년차	2013.8~ 2014.8	<ul style="list-style-type: none"> <li>□ 산양 및 유산양에서의 수정란이식 기술 확립               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 중간 교배 조합 수정란의 발생능 조사와 이식에 의한 잡종 생산                   <ul style="list-style-type: none"> <li>- 수정란 생산을 위한 다배란 처리로 회수수정란 수 개선 (5.0개/두 이상)</li> <li>- 중간 체외수정란 및 인공수정(신선) 수정란의 회수율 개선</li> <li>- 수정란이식에 의한 타품종 순종 생산</li> </ul> </li> <li>○ 재래산양 기반 중간 체외수정란 발생 능 비교                   <ul style="list-style-type: none"> <li>- 유산양, 누비양, 무플른 정자 IVF x 산양(우) 난자</li> <li>- 품종별 체외수정란의 발생을 조사</li> </ul> </li> <li>○ 채란, 수정란 생산 및 이식 기술 확립                   <ul style="list-style-type: none"> <li>- 비외과적 채란 및 이식기술 확립(초음파기기 및 내시경적)</li> <li>- 외과적 채란 및 비외과적 채란의 성적 비교</li> <li>- 수정란이식에 의한 분만율 개선 : 30% 이상</li> </ul> </li> <li>○ 재래산양 기반 난자로부터 핵이식 수정란 생산기술 확립                   <ul style="list-style-type: none"> <li>- 핵이식수정란의 발생을 조사 (발생 10% 이상 개선)</li> </ul> </li> </ul> </li> </ul>

### 3. 3년차 연구개발의 내용과 범위

구분	연도	연구개발의 목표 및 주요 연구 내용
3년차	2014.8~ 2015.8	<ul style="list-style-type: none"> <li>□ 재래 산양을 근간으로 하는 종(種) 간 및 품종 간 집중 생산               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 산양(백산양x흑산양), 유산양 및 무폴른 등에서 품종간 교배 조합 (인공수정)에 의한 모색유전 양상 조사(다양성 확립)</li> </ul> </li> <li>□ 산양 및 유산양에서의 핵이식 기술 확립               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 수정란 및 체세포 복제 기술 확립                   <ul style="list-style-type: none"> <li>- 재래산양 난자, 수정란 기반 중간 핵이식수정란 발생 능 비교</li> <li>- 유산양, 누비양, 무폴른 수정란 핵 및 체세포 배양</li> <li>- 핵이식란의 체외 발생 능 조사</li> </ul> </li> </ul> </li> <li>□ 품종 간 상호 복제 수정란 생산 및 이식               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 중간 핵이식 수정란의 생산과 이식                   <ul style="list-style-type: none"> <li>- 품종간 상호 산양 및 유산양 복제수정란이식 및 산자 생산</li> </ul> </li> <li>○ 재래산양 기반 난자로부터 핵이식 수정란 생산기술 확립                   <ul style="list-style-type: none"> <li>- 핵이식수정란의 발생을 조사 (발생율 20% 이상 개선)</li> </ul> </li> </ul> </li> </ul>

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 국내 현황

#### 1. 국내 산업 현황

##### ○ 국내 재래산양 산업 현황

우리나라 지역별 사육농가수와 사육두수현황을 살펴보면 전라남도가 134,872두로 전체 24%를 차지하고 있으며 경상남도가 89,808두로 16.0%로 남부지역의 사육두수가 전체 사육두수의 40%를 차지하고 있음. 도별 산양사육순위는 전남>경북>경남>충남>전북>충북>강원>경기도순으로 조사되었음. 사육농가수로는 전라남도의 사육호수가 12,422호로 가장 많으며, 다음으로는 경남이며, 유산양의 사육두수는 전라북도가 28,345두로 가장 많음. 그러나 충남 지역은 시장 접근성에서 가장 유리함.

표 1. 우리나라 산양 사육현황 -가축사육 농가 및 두수

	유산양:농가 (가구)	유산양:마리수 (마리)	염소:농가 (가구)	염소:마리수 (마리)
<b>전국</b>	<b>465</b>	<b>35,030</b>	<b>48,546</b>	<b>562,067</b>
서울특별시	-	-	10	285
부산광역시	-	-	169	2,271
대구광역시	2	26	343	7,837
인천광역시	16	123	249	4,266
광주광역시	4	57	143	2,243
대전광역시	5	30	77	1,492
울산광역시	2	2	180	3,757
경기도	41	690	1,387	31,271
강원도	40	986	1,932	34,104
충청북도	39	1,632	3,408	49,172
<b>충청남도</b>	<b>76</b>	<b>580</b>	<b>6,070</b>	<b>56,325</b>
전라북도	54	28,345	4,034	49,909
전라남도	84	1,899	12,422	134,872
경상북도	45	271	6,284	93,395
경상남도	56	374	11,808	89,808
제주도	1	15	30	1,060

\* 2008년 통계청 농업총조사

전국흑염소전업농협의 2009년 보고에 따르면 국내 흑염소 사육 현황 (2008년 말기준)으로 국내 흑염소 사육두수는 372,000두이며, 사육농가(흑염소)수는 27,555호로 연간



고기 생산량은 약 4,800톤으로 총생산액은 912억원이며 증탕 생산액은 180억원 수준임 (총 1,092억원). 양고기 수입 현황으로는 산양고기 177.6t, 면양고기 3,429.2t으로 총 3,606.8t임. 국내 염수고기 소비량에서 수입고기의 소비량이 차지하는 비율은 43.9%이며, 수입금액은 288.5억원으로 국내 산양고기 총 생산액의 31.6%를 차지 함.

현재 국내에 존재하는 산양(염소) 및 양의 품종은 재래 산양(백색 및 흑색)을 포함하여 자아넨(유산양), 무플런, 바바라양, 코리텔(양), 큰빨양, 흰오릭스, 블랙벅, 블레스북, 겐스북, 그레이터쿠드 등으로 약 10 품종이 사육 또는 보존되고 있음(서울대동물원 포함).

## 2. 국내 연구 현황

국내 연구 현황으로는 국립축산과학원 유전자원연구소를 중심으로 산양연구가 이루어지고 있는 실정 임.

- 한국 재래산양의 임신기간 중 혈중 progesterone 및 estrone sulphate 농도의 변화 (이장희 석사논문, 경상대, 1987)
- Chicory급여가 재래산양의 발육 및 육질에 미치는 영향(최순호 등, 1998. 한축지 40 : 255-260)
- 흑염소의 거세 및 사향선제거가 성장 및 육질에 미치는 영향(최순호 등, 2000. 동물자원지 42 : 891-896)
- 박정선 등(2010)은 2-세포기 산양수정란에서 DNA methylation의 활성화 소실에 대한 연구를 발표 함.

## 3. 국내 연구 개발의 문제점

- 우리나라 산양 산업의 국가적 연구 지원 부족
  - 정부 지원에서 소외받은 축산분야지만 고부가가치 축종(근거자료 : 축산신문, 2008.11.21일자 보도). 정부 차원에서의 연구지원 부족.
- 수입육에 따른 농가 피해 극심으로 산양산업 위축
  - 산양육 소비의 자급률을 높이기 위해서는 국가적으로 대처하여 수입 산양육에 따른 외화지출 억제 필요
- 국내 연구 결과 미흡
  - 활용 자료(논문, 서적 등) 미흡

### (4) 필요 연구 분야

- 산양 및 유산양에서의 규모화 인공수정 기술 기반 확립
  - 생식세포(정자 및 난자) 동결기술 확립

- 발정동기화에 의한 규모화 번식기술 확립
- 중간 교배조합(인공수정)에 의한 중간 잡종 생산(가능성 검증)  
(면양우X산양♂, 산양우X무플런♂, 산양우X한우♂)
  - \* 중간 자연교미는 체격 차에 의해 자연 상태에서는 거의 불가능
- 비번식계절에서의 인위적 수태 기술 확립(유산양)
- 산양 및 유산양에서의 수정란이식 기술 확립
  - 중간 교배 조합 수정란의 발생능 조사와 이식에 의한 잡종 생산
  - 채란, 체외수정, 수정란 생산 및 이식 기술 확립
  - 비외과적 채란 및 이식기술 확립(초음파기기 및 내시경적)
- 산양 및 유산양에서의 핵이식 기술 확립
  - 수정란 및 체세포 복제 기술 확립
  - 품종 간 상호 복제 산양 및 유산양 생산
  - 중간 핵이식 수정란의 체외배양과 이식
- 핵이식 기반에 의한 국내외 유용 산양 및 유산양 생산
  - 생축 도입에 의하지 않고 국외 산양(육용) 및 유산양(다산) 생산
  - 대형(인도의 Jamnapari 품종) 및 다산(앵글로누비안 품종) 산양 도입 필요



<재래산양, Jamnapari(대형) 및 앵글로누비안(다산) 품종>

\* 필요시 서울대동물원 자원 활용(염소 및 면양 9품종 보유)

- 재래 산양을 근간으로 하는 종(種) 간 및 품종 간 잡종 생산
  - 산양(백산양x흑산양) 및 유산양에서의 품종간 교배 조합(인공수정)에 의한 모색유전 양상 확립(다양성 확립) 필요

## 5. 연구개발의 추진 전략

본 연구의 효과적인 추진과 연구성과의 극대화를 위하여 실행하고자 하는 연구개발의 추진 전략은 충남에 집중되어 있는 동물자원관련 연구기반 및 관련 대학 등의 인프라를 적극 활용(국립축산과학원, 충남농업기술원, 충남가축위생시험장 및 충남대, 충북대, 천안연암대, 단국대, 공주대, 건양대-동물자원센터 등)코자 함.



1) 연구개발의 추진 방법

바이오컬처(주) 유전자원연구소에서 시험축을 보유하고 연구 개발을 수행하면서 필요시에는 현장 적용 연구 수행을 위하여 인근 2~3농가(전국흑염소 전업농협회 소속) 참여를 유도하고 개량과 번식기술 무상 적용으로 농가 생산성 향상에도 기여코자 함.

첨단 장비 및 기법 적용은 인근 대학(단국대) 및 연구소(국립축산과학원) 인력 및 장비를 활용하되 필요시 전문가 자문, 용역형태로 기술교류를 통하여 해결하고자 함.

2) 추진체계

- 기관 조직을 적극 활용하되 인근 인프라 인력 및 기술교류로 추진
- 체계도
  - 인근 지역 인프라 적극 활용



- 인공수정(정액) 및 수정란이식 공급 시스템 구축 방안



3) 연구개발의 추진일정

연구 내용	추진 일정			
	1년차	2년차	3년차	4년차
○ 추진목표 : 산양 및 유산양에서의 규모화 인공수정 기술 기반 확립	■	■	■	
- 추진내용 : 생식세포(정자 및 난자) 동결 기술 확립	■	■		
- 발정동기화에 의한 규모화 번식기술 확립	■		■	
- 비번식계절에서의 인위적 수태 기술 확립		■	■	
○ 추진목표 : 산양 및 유산양에서의 수정란 이식 기술 확립	■			
- 추진내용:종간 교배 조합 수정란의 발생능 조사와 이식에 의한 잡종 생산	■	■	■	
○ 추진목표 : 산양 및 유산양에서의 핵이식 기술 확립	■		■	
- 추진내용:수정란 및 체세포 복제 기술 확립	■	■	■	
- 산양(백산양x흑산양) 및 유산양에서의 품종간 교배 조합	■			
- 품종 간 상호 복제 수정란 생산 및 이식	■		■	

## 제 2 절 국외 현황

### 1. 국외 연구 현황

#### ○ 산양(goat) 및 면양(sheep) 생식세포 연구 현황

- Forouzanfar(2010) , De Paz(2010) , D'Han 등(2010)은 면양정액동결에서 동해방지제로 Soybean-lecithin 보존액이 난황 보존액보다 생존성에 액간 유리하다고 보고함(Theriogenol. 73: 480~487, 541~549, 663~671)
- 분말코코넛 water(ACP TM, 브라질)로 물고기정액동결, Bioxcell extender(Akhter 등 2010. Ther 74:951~959).
- Belly등(2010)은 암,수 정자 분리된 면양 정액의 동결에서 5% glycerol 보존액이 유리하다고 보고함(Ther 74:786~794).
- El-Gayar 등(2011)과 Al Yacoub 등(2011)은 산양 수정란의 open pulled straw 초자화동결로 임신율을 높일 수 있었다고 보고(Reprod. fert & Dev, 23:141, Theriogenol. 73:1018~1023)하였으나, Yu 등(2010)은 closed pulled straw 초자화동결이 오염방지에 유리하다고 보고함(Theriogenol 73:474~479).
- Joseph과 Arav(2011) 면양 난포란 및 수정란동결 연구, Willadsen 등(1974, 1976)은 면양의 Bilton과 Morve(1976)은 산양의 동결수정란으로부터 산자 생산 성공

#### ○ 번식 내분비와 인공수정, 수정란이식 및 핵이식(복제) 관련 연구

- 3가지 질 내 삽입장치인 DICO(P<sub>4</sub> 0.3mg , 아르헨티나), CIDR-G, MPA sponge (60mg medroxyprogesterone acetate)로 6일 동안 질 내에 정치한 후 제거하고 PGF<sub>2</sub> $\alpha$  (clopsterol)와 eCG(300IU, Novormon)를 주사하고 48~54시간 후에 2억마리의 정자로 경관내 주입하고 내시경적 자궁내 주입으로 인공수정하였을때 수태율은 경관 내 주입(39.5%), 자궁내 주입이 56.3%였으며 질내장치는 각각 55.7%, 55.8% 및 37.4% 였다고 보고함(Garcia-pinto 등(2011, Reprod. Fert & Dev. 23(1) : 114)
- Nuno Costa-borges 등(2011) 은 산양과 생쥐의 난포란에 demecocine 및 nocodazole 처리로 중간 체세포 핵이식율을 높일 수 있었다고 보고함(Theriogenol, 75:527~541).
- Asgari 등(2011)은 면양에서 초자화동결된 체외성숙난포란의 동결에서 핵성숙과 배반포 발생에 짧은 용해시간(3분)이 유리하다고 하였음(Theriogenol., 75:904~910).
- Bordignon 등(2011)은 면양의 복제수정란 생산 시 융합후 10~12시간동안 Scriptaid (50um)처리가 착상율(임신율)을 높일 수 있다고 하였음(Reprod. Fert. & Dev, 23:121).
- Colato 등(2001)은 아르헨티나에서 40마리의 Raza Criolla 산양과 잡종면양으로부터 내시경적 난포란을 채란하여 산양2두에 체세포 핵이식으로 복제 2두의 Bore 산양과

Dorper 면양 생산에 성공하였다고 보고함. 2마리 면양5두에 핵이실하여 3두의 생산에 성공하였다고 보고함(Reprod. Fert. & Dev, 23:123).

- Nordstoga 등(2010)는 같은 총정자수로 2회수정과 2회수정에 대한 수태율과 산자수에서 차이가 있음을 보고 함(Theriogenol., 74:895~900)
- 예정시각 소 AI(Chaikhun 등, 2010. Theriogenol., 74:1371~1376)
- Forcada 등(2011)은 면양에서 체내수정란 생산을 위한 FSH 210IU/ eCG 500IU 1회 투여로 과배란유도 한 결과 수정율이 다소 높았다고 보고함(Theriogenol, 85:769~776). 다배란 처리 전에 anti-eCG antibodies를 투여함.
- Zhang 등(2010)은 humen lysosomal acid B-glucosidase(hGCCase) 유전자가 형질전환된 산양 수정란 이식 후 임신에 성공(Theriogenol 73:681~690)

## 2. 국내.외 연구 현황 비교

### ○ 산양

- 산양 교잡연구는 1963년부터 1977년까지 15년간에 걸쳐 축산시험장에서 재래산양과 유산양인 자아넨과의 교잡종 개량 연구를 수행한 결과 비유량과 비유기간에 있어서도 자아넨종과 누진교잡을 거듭시킴으로써 자아넨종과 거의 비슷한 결과를 나타내었다고 함

- 1979년부터 1983년까지 재래산양을 보다 대형화로 육성하고자 1960년대부터 연구하여온 한국 자아넨종 육성연구과정에서 개량된 흑색 한국 자아넨종을 종모축으로 사용하여 재래산양과 교잡하여 시험을 수행한 결과 생시체중은 재래산양이 암, 수 각각 1.7kg, 2.0kg이었고 흑색 한국 자아넨종은 우 2.6kg, ♂ 2.9kg이었으며 여기서 생산된 흑색 1대와 2회 교잡종의 생시체중은 재래종에 비하여 각각 11.8%와 15.0%~29.4% 더 증가하였으며 12개월령 체중에 있어서도 재래종보다 각각 15.2%와 16.7%더 증가하였고 체위 또한 누진교배가 거듭됨에 따라 증가하였다고 보고 함. 이모색 출현율은 흑색한국자아넨종이26.3%이었고 흑색 1대와 2회교잡종은 각각 13.4%와 14.5%이었으며 교배종간 교잡종은 22.0%이었다고 함(축산연구 50년사. 2002).

- 재래산양의 순수개량은 체구가 작고 발육이 늦어 대다수 농가들이 체구가 큰 외국산양과 교잡화가 심하여 재래산양의 유전자원보존이 절실히 요구되어 1995년의 순수번식에 의한 능력검정을 실시한 결과 번식률은 86.5%~89.0%이었고 단태율은 34.5%, 쌍태율은 52.7%그리고 삼태율 12.7%이었으며 연속 삼태 분만율은 8.15%이었다고 함.

### ○ 면양

- 1973년부터 1990년까지 국립종축장 운봉지장에서 도입 면양의 능력검정을 실시한 결과 도입초기에는 면양들이 국내 기후환경에 대한 스트레스와 사양조건의 변화 등으로 산모량과 발육이 저조하였으나 '75년도부터 점차적으로 국내 기후환경에 적응하여 산모량과 발육이 증가 추세였으나 '80년 이후 노령화와 근친효과로 능력이 점차적으로 낮아지는 경향이있음(축산연구 50년사. 2002).

- 1977년 사양 생산시기가 면양의 번식, 발육, 폐사에 미치는 영향을 비교 조사하

기 위하여 조기종부(10.1~11.18)와 만기종부(11.13~12.31)구로 나누어 시험한 결과 발육에 있어서는 차이가 없었으나 조기 종부구가 번식률 99%, 쌍태율 6.5%, 폐사율 15.7%로 만기 종부구보다 유리한 경향이었다고 함(축산연구 50년사, 2002).



## 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

### 제 1 절 산양의 규모화 인공수정 기술 확립

#### 1. 생식세포(정자 및 난자) 동결기술 확립

##### 가. 시험축 확보 및 사양관리

시험에 사용된 산양(수컷 4, 암컷 40) 및 무플런(수컷 2)을 구입하여 암 수 구분하여 사육하였다. 공시 산양의 체중은 30 kg 전후의 임신된 산양으로 천안 근교의 사육농가로부터 임상적으로 건강하다고 인정되는 것을 구입하여 바이오컬처(주)의 시험농장(Fig. 1)에서 사육하면서 내·외부 기생충 구제와 일정기간 동안 적응시킨 다음 본 연구에 사용하였다. 사양관리는 일반 관행법에 따라 사육하되, 농후사료는 추가급여하고 식염과 물은 자유섭취토록 하였다.



Fig. 1. 산양 농장 전경 (2012년, 바이오컬처㈜)

일반적으로 산양의 계절 번식은 가을부터 겨울까지의 일조시간이 짧아지는(단일성) 시기에 번식계절이 개시되지만 우리나라의 산양은 서식지의 위도가 낮아지고, 연간 환경의 변화가 적을수록 계절의 영향을 적게 받아 주년번식하는 경향이 많다. 산양의 계절 번식은 일조시간, 온도 및 영양상태 등이 주로 영향을 미친다. 뿐만 아니라 산양의 번식기의 개시와 기간은 위도, 기후, 품종, 생리상태, 번식체계 및 광주기 등 많은 요인들이 영향을 미친다(Fatet, 등, 2011). 계절 번식동물은 눈의 망막에서 빛의 정보를 감지한 다음, 이 정보가 송과선으로 전달되어 멜라토닌의 분비를 자극하고, 분비된 멜라토닌이 시상하부-뇌하수체계의 분비 활성을 변경시켜 GnRH의 분비가 조절되는 기전에 따라 번식계절이 지속된다. 비번식기의 시작은 일조시간의 변동에 의하여 광주기 효과가 망막로를 거쳐서 시상하부에 도달되면 시상하부의 성선자극호르몬(GTH)방출 중추를 자극하여 estradiol 방출중추를 자극한다. 따라서 GTH의 감소, estradiol의 감소가 일어나며, 배란이 중지되어 무발 정기로 들어가게 된다. 반대로 번식기의 시작은 일조시간의 변화 자극이 시상하부의 GTH 방출 중추를 자극하여 GnRH분비, estradiol

의 상승이 일어나며, LH-surge가 일어나 배란이 일어나고, 정상적인 발정주기를 갖게 된다. 재래산양은 임신기간이 150일로써 년 2회 번식이 가능하나, 우리나라의 경우에는 자연적인 조건 하에서 2년에 3회 번식이 되고 있는 실정이다. 하지만 인위적 호르몬처리에 의한 발정유기 방법을 이용하면 년 2회 번식이 가능하다. 여기에 발정동기화와 과배란기술을 동시에 이용하면 계절 번식성이 강한 유산양과 같은 동물은 비번식기에도 산자 및 우유생산이 가능하다 (Corteel 등, 1988). 또한 발정동기화 기술은 생산관리에 있어서 핵심 기술이며 교미, 분만, 고기 및 우유 생산 수준 등을 특정시기에 인위적으로 조절이 가능하다고 알려져 있다. (Baldassarre 등, 2004). (윤운진과 박희성, 2013).

#### 나. 산양 정액의 채취 및 동결 보존

산양의 정액채취는 마취후 외부생식기를 세척, 소독하고 발기되지 않은 상태에서 전기자극 정액채취기(Electroejaculator, Walmur Co., Brazil)를 직장 내에 삽입하고 천추부위를 3-5초간 통전, 3-5초간 절전으로 수회 반복 자극하여 정액을 채취하였다(Fig. 2)

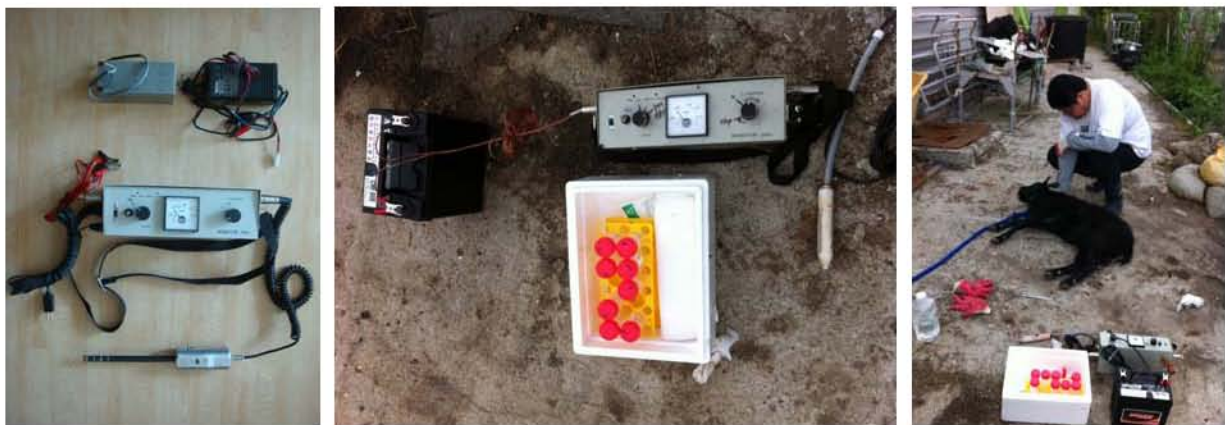


Fig 2. 전기자극 정액채취기에 의한 산양 정액 채취

산양(흑염소)과 무플런(Mouflon)의 인공수정을 위한 동결정액 생산기술을 확립하기 위해 동해보호제가 동결 용해 후 내동성에 미치는 영향을 조사하여 생존성이 우수한 동해보호제를 찾아내고자 하였다. 이를 위해 수컷 산양 및 무플런 2두에 대해 각각 전기자극정액채취법으로 정액을 채취하여 채취 직 후부터 동결 용해 후까지 활력(생존성)을 단계별로 조사하였으며, 이 때 동해보호제로는 1차 보존액에 각각 egg yolk(20%, v/v), skim milk(10%, v/v), soybean milk(10%, v/v) 및 dried persimmon(건조 꽃감 1.0%, w/v)을 첨가하여 1차 보존액으로 제조하였으며 2차 보존액은 1차 보존액에 glycerol 12.8%(v/v)를 첨가하여 2시간 이상 교반하여 평형 시킨 후 2차 보존액으로 사용하였다. 정액의 동결방법은 Trish Berger(1989, Theriogenol. 32:69-77)의 방법에 준하였으며, 0.25ml에 충전하여 동결하였으며, 최종 정자 농도는  $1.2 \times 10^8$  cell/ml가 되도록 하였다. 산양과 무플런 정자의 동결보존 시 동해보호제로 egg yolk, skim milk, soybean milk 및 dried persimmon을 사용하였을 경우 동결 용해 후 활력을 조사한 결과는 Table 1과 같았다.



Table 1. Effect of cryoprotectant on goat sperm cryopreservation.

Cryoprotectant	Goat, Motility(%) of Sperm				Mouflon, Motility(%) of Sperm			
	Egg Yolk	Skim Milk	Soybean Milk	Persimmon	Egg Yolk	Skim Milk	Soybean Milk	Persimmon
After collection	92.5	90.0	92.5	90.0	85.0	85.0	85.0	85.0
Before preservation	85.0	80.5	85.0	60.0	72.0	60.0	75.0	70.0
After preservation	75.5	72.5	75.0	55.5	60.0	50.5	65.0	45.0

Table 1에서 보는 바와 같이 동해보호제의 종류에 따른 내동성(활력)은 동물성인 egg yolk가 75.5%로 가장 높았으며, 식물성의 soybean milk도 75.0%의 높은 활력을 나타내었다. Dried persimmon(곶감)을 사용하였을 경우에는 가장 낮은 45.0%의 활력을 나타내었다. 무플론(Mouflon) 정자의 동결 성적은 전반적으로 산양보다 매우 낮은 경향을 나타내었다.

한편 시정모로 사용할 수컷 산양 1두는 KetamineHCl(Ketaset, USA) 2mg/kg(BW) 및 Xylazine HCL(Rompun, USA) 0.25mg/kg(Body Weight)을 근육 주사하여 전신 마취한 후에 정소의 상단 정중부에 약 5cm를 절개하여 양측의 정색부분 안쪽을 통과하고 있는 2가닥의 정관을 돌출시켜 1~2cm 간격으로 2회 결찰한 후 봉합하고 오염을 방지하기 위해 피복제로 도포하여 정관수술을 완료하였다(Fig. 3).



Fig. 3. 정관수술을 마친 산양 시정모

한편, 산양에 있어서 발정확인율을 개선하기 위하여 시정모를 이용한 결과 육안적 관찰(대조구)에 비하여 발정확인율이 33.1% 증가하여 90.6%의 발정확인율을 나타내었다(Table 2).



Table 2. Rate of estrus detection by teaser vs 육안적 관찰.

	Head (numbers)	Period(mon.)	Rate of estrus detection(%)
Control	Group I (20)	2012. 9 ~ 2013. 12 (3)	46/80 (57.5)
Teaser	Group II (16)	2013. 9 ~ 2014. 12 (3)	58(5)*/64 (90.6)

\* (5)는 단발정(발정 지속시간이 12시간 이내인 발정) 수

산양의 경우 정상적인 발정인 경우에도 발정주기가 매우 짧은 단발정(지속시간이 12시간 이내)도 5 마리가 관찰되었다.

## 2. 발정동기화 및 다배란 처리

### 가. 발정동기화(다배란 처리) 및 인공수정

산양의 과배란 유기는 주로 FSH(또는 PMSG)와 progesterone 병용 투여방법(Tervit 등, 1984)이 많이 사용되고 있다. FSH(또는 PMSG)를 이용하여 다수의 난포를 일시에 발육시키고 PGF<sub>2</sub> $\alpha$ 를 병용 처리하여 황체의 기능을 함께 조절하는 방법이 응용되고 있다. 하지만 FSH는 반감기가 짧은 관계로 잦은 투약처리(6시간 간격)가 불편하고, PMSG는 반감기가 너무 길어 발정 지속시간이 매우 길게 나타나는 경향이 많았다.

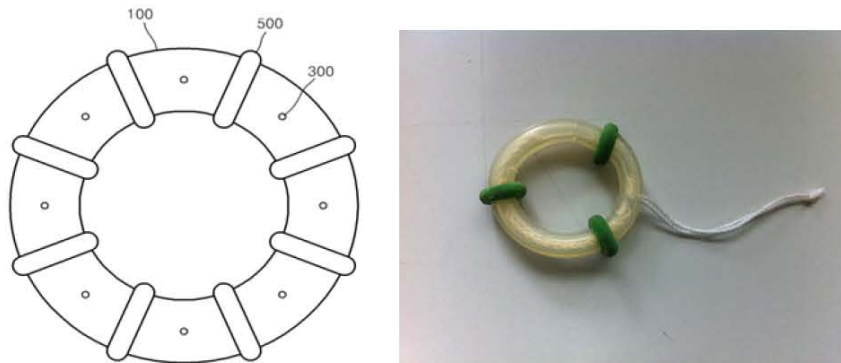


Fig. 4. Ring-CIDR 도면과 모형 및 주입장치

(특허 등록명 : 성 호르몬 방출 장치 및 이를 이용한 동물 피임 및 발정 유도 방법. 제 1263916 호. 2013. 5. 7)

따라서 산양의 개량 및 번식 효율을 개선하고 핵이식수정란 생산 기술을 개발하기 위하여 발정 동기화, 다배란처리가 난포의 발달에 미치는 영향을 조사하기 위해 산양 18두에 대해 각각 6두씩 2회 반복 처리하였으며 **Group I** 은 번식계절 도래 시기(9월 말)에 GnRH(휘타길 1.5ml)를 주사하고 1주일 후에 PGF<sub>2</sub> $\alpha$ (Lutelys 1.0ml)와 PG 600(1.5ml)\*\*을 주사하고 48시간 후에 수술하여 난포란을 채란하였으며, **Group II** 는 번식계절 중(10~12월)에 대해 PGF<sub>2</sub> $\alpha$ (Lutalyse, 1.0ml)를 주사하고 2일 후 PG 600(1.5ml)와 GnRH(휘타길, 1.5ml)를 병용 주사한 후 48시간 때에 채란하였으며, **Group III** 은 비번식계절(4~6월) 중에 Ring-CIDR(Fig. 4) 장치와 GnRH(휘타길1.5ml)를

주사하고 11주일 후에 PGF<sub>2</sub>α (Lutelys 1.0ml)을 주사하고 24시간 후에 FSH(Folltropin V, 1.5ml)와 GnRH(휘타길, 1.5ml)를 병용 주사한 후 24시간 후에 채란하여 각 Group에 대해 3두씩은 난포수와 회수된 난포란의 수를 조사하였으며(Fig. 5), 3두씩은 PGF<sub>2</sub>α 주사 후 72시간 후에 예정시각 인공수정을 Fig. 6과 같이 실시하였으며, 정액주입방법은 Fig. 7과 같았다.



Fig. 5. 산양의 다배란 처리 난자의 회수(외과적 수술)

처리별 인공수정 후 수태율(non-return rate)은 Table 3과 같았다. Table 3에서 보는 바와 같이 인공수정을 위한 호르몬 처리법으로 Group II, III에서 수태율이 각각 83.3%로 높게 나타났다. Ring-CIDR에 의한 비번식계절에서의 발정동기화에 의한 Non-return rate(%)은 50.0%로 번식계절의 수태율보다 낮았으나 비번식계절의 수태 방법으로 적용 가능하다는 결론을 얻었다.

Table 3. The result of artificial insemination

Group	No. of goat fertilized	Non-return rate (%)
I	6	5 (83.3)
II	6	5 (83.3)
III	6	3 (50.0)

**유·산양의 년중 계획번식에 필수품**

Ring-CIDR은? 194 지방동물형 long type controlled internal drug release(지속 방출) progesterone 방출장치 (산양용)입니다. (21-2001-1492)

**산양·유산양·면양 발정동기화 처리방법**

Ring-CIDR을 질내 삽입하여 12일 후 제거하고 hCG 200 ~ 400 IU 근육주사 한 후 44~52시간 후에 인공수정

Ring-CIDR 11일간의 질내에 삽입

Ring-CIDR 11일 후 제거 (1915년 9월) (2015년 9월) 인공수정 44~52시간 후

hCG 200~400 IU (2015년 9월) (2015년 9월) 인공수정 44~52시간 후

**방법) Ring-CIDR을 질 내에 11 ~ 14일간 장치 후, 제거하고 바로 발정유도를 위하여 PG600 (1~2ml), hCG(100~200 IU) 또는 PMSG (100 IU)를 택하여 주사, 44~52시간 후 인공수정**

**<Ring-CIDR 삽입요령>**

1. 외음부 소독
2. Ring-CIDR 주입기 소독(5% 베타딘용액에 침지)
3. Ring-CIDR의 부 및 주입기 내외부에 충분히 도포
4. Ring-CIDR을 주입기 내에 잠깐(잠수 그림)
5. 외음부를 약간 벌려 주입기를 삽입하고, 주입기 선단을 경관입구까지 전진
6. 손잡이내의 주입기들을 밀어서 경관입구에 Ring-CIDR가 위치하도록 함
7. 주입기를 반 쪽 외음부를 마사지하고 출몰 약간 양겨 장축치 트럭 한 다음 끈이 외음부 약 1~2cm 정도 노출되도록 격암판 밑에 트 자름
8. Ring-CIDR 삽입 24시간 후에 발정여부 반드시 확인 (발정시 새로운 Ring-CIDR주입)
10. 제거시에는 노출된 끈을 잡고 배낼(제거시 흰색분비액 과다시에는 베타딘으로 소독)

Fig. 6. 산양의 예정시각 인공수정 방법





Fig. 7. 산양의 정액주입 방법(질경 이용법)

### 3. 산양의 난포란 채란과 체외성숙 및 체외수정

#### 가. 난포란의 채란

산양의 호르몬 및 마취제 투여는 불잡아서 근육 주사하였으며, 채란 시 마취는 KetamineHCl(Ketaset, USA) 2mg/kg(BW) 및 Xylazine.HCl (Rompun, USA) 0.25mg/kg(Body Weight)을 근육 주사하여 마취하였다. 마취 후 복부를 절개한 후 자궁과 난소를 도출시킨 다음 난포수를 조사하고 난포에 주사침(19G)을 찔러 음압을 작용시켜서 난포란을 회수하였다. 회수된 난포란은 배양액(HI99-10)에 세척한 후 현장에서 현미경으로 수집하여 난포란의 등급별로 수를 조사한 결과는 Table 4와 같았다.

Table 4. Number of follicles and recovered ovum on the treatment of hormones.

Group	No. of follicles					No. of recovered ovum	Recovery (%)
	Total	Mean±SD	Good	Fair	Poor		
I	50	8.3±3.2	14	20	16	36	72.0
II	52	8.6±3.4	13	24	15	39	75.0
III	48	8.0±4.2	7	25	16	32	66.7

\* Group I : GnRH를 주사 ⇨ 1주일 후에  $PGF_2\alpha$  + PG 600 주사 후 48시간 때에 채란.

Group II :  $PGF_2\alpha$  주사 후 2일 후 PG 600 + GnRH 주사 후 48시간 때에 채란.

Group III : Ring-CIDR 장치 + GnRH 후 11일 후  $PGF_2\alpha$  주사하고, 24시간 후 FSH + GnRH주사 후 24시간 때에 채란.

\*\* PG 600 : ml당 PMSG 400IU+hCG 200IU가 함유되어 있음.

본 연구 결과 산양의 난포발달은 번식계절 중(Group II)이 번식계절 도래 시(Group I)보다 호르몬 처리에 대한 반응이 다소 높게 나타났으며( $8.6 \pm 3.4$  vs  $8.3 \pm 3.2$ ), 난포발달에 영향을 미치는 호르몬처리로 PG600(Group II)과 FSH(Group III)처리에서는 PG600 처리가 난포발달 및 회수율이 다소 높게 나타났다( $p < 0.05$ ). 이는 계절번식 기간이 다소 난포발달에 효과적이었으나 난소반응이 비슷한 수준으로 보아 우리나라 재래산양의 계절번식성은 희박하다고 할 수 있다.

#### 나. 난포란의 체외성숙 및 체외수정

체외성숙 전과 체외성숙 후의 난포란 상태는 Fig. 8과 같았다(상단). 한편 일부의 성숙 난자는 생사 여부를 확인하기 위하여 trypan blue 및 형광염색을 실시하기도 하였다. (Fig. 9).

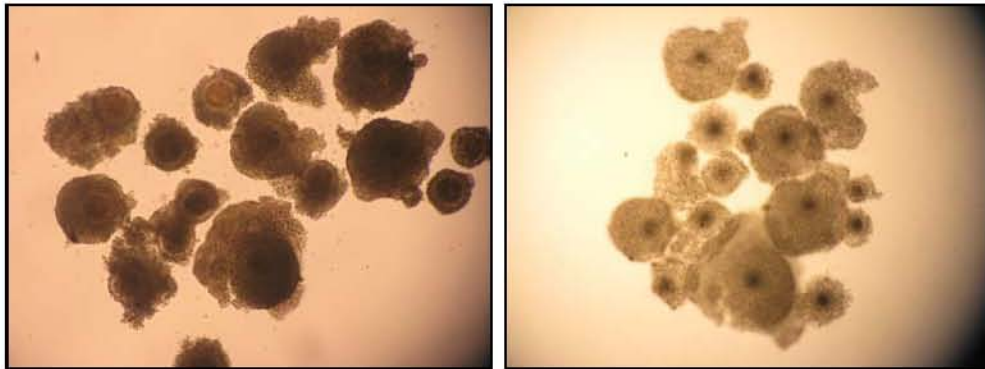


Fig. 8. 산양 난소에서 채란된 성숙개시 전.후의 난포란

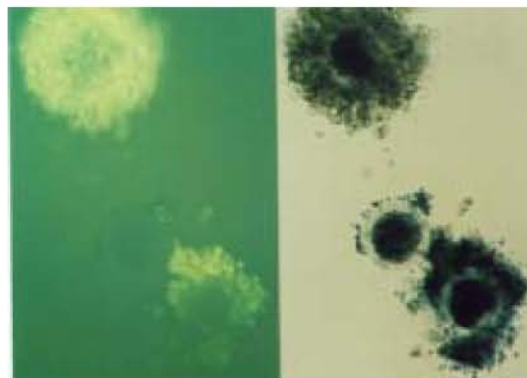


Fig. 9. 돼지 성숙 난포란의 생사확인 결과

성선자극호르몬(gonadotropins)을 FSH+GnRH, FSH+hCG, PMSG+GnRH 및 PMSG+hCG로 조합하여 첨가된 성숙배양액에서 36시간 성숙시킨시켰을 때 체외성숙율은 Table 5와 같았다.

Table 5에서 나타난 바와 같이 체외성숙율이 PMSG+hCG 첨가구에서 87.5%의 성숙율(CEI = 2.28)로 가장 높게 나타났다. 산양 난포란의 체외성숙율에서는 PMSG가 난포란의 체외성숙에 가장 유효하게 작용함을 알 수 있었다.

**Table 5. Cumulus cells expansion after in vitro maturation in 3 different oocyte types**

Hormones	No. of oocytes <sup>1)</sup> examined	Degree of cumulus cells expansion				CEI <sup>3)</sup> (x ± SD)	
		1	2	3	Maturation rate(%) <sup>2)</sup>		
FSH	GnRH	53	12	24	17	41(77.3)	2.09±0.08
	hCG	55	11	29	15	44(80.0)	2.07±0.03
PMSG	GnRH	54	9	25	20	45(83.3)	2.20±0.06
	hCG	56	7	26	23	49(87.5)	2.28±0.07

\* 1) Oocytes were cultured for 36 hrs in maturation medium containing different combination of gonadotropins(5ug/ml FSH or 10IU/ml PMSG and 10ug/ml GnRH or 10IU/ml hCG)

2) Maturation rate(%) = 시험에 제시된 난포란 중에 난구세포 팽화정도가 2와 3인 난포란의 수를 합친 비율

3) CEI(cumulus cells expansion index) was defined as :  
where,

$$CEI = \frac{\sum D_i F_i}{\sum F_i}$$

D<sub>i</sub> : ith value for degree of cumulus expansion, i = 1, 2, 3.

F<sub>i</sub> : Frequency corresponding to D<sub>i</sub>

이와 같은 성적은 Minato와 Toyoda(1982)가 m-KRB배양액에 또는 hCG를 첨가 후 48-54시간의 성숙에서 hCG보다 PMSG첨가에서 난구세포의 팽화와 핵성숙이 높았다는 결과와 Yoshida등 (1989)이 TCM-199배양액에 PMSG, hCG, PMSG+hCG 의 첨가 후 42시간 성숙에서 hCG보다 PMSG가 난구세포의 팽화와 핵성숙율은 현저하게 촉진시켰다는 결과와 일치된 결과였다. 또한 Wu 등(1992)도 성숙배양액에 PMSG를 첨가함으로써 metaphase II 도달율이 67.6%로 무첨가에서 보다 현저히 증가시켰다는 결과와도 같은 경향이였으며 Kim,등(1990)도 체외성숙시 PMSG와 hCG의 첨가로 성숙율의 향상을 보고한 바 있다. 그러나 Mattioli 등 (1991)이 GnRH 또는 FSH가 첨가된 TCM-199배양액에서 성숙시켰을 때 metaphase II 도달율이 GnRH보다 FSH에서 더 높았던 결과와 소의 경우 Hensleigh 와 Hunter(1985)가 난포란의 체외성숙시 FSH 또는 hCG를 첨가하였을때 난구세포의 팽화비율이 hCG보다는 FSH에서 더 높게 보고하였던 결과는 본 실험결과와 다소 차이가 있었다. 본 연구에서 FSH보다는 PMSG+hCG를 함께 첨가할 때 성숙에 더 유리한 것으로 나타났으나 그 원인과 최적의 첨가수준에 대해서는 더 규명되어야 할 부분으로 사료되었다.

성선자극호르몬(gonadotropins)으로 GnRH+FSH, GnRH+PMSG, hCG+PMSG 및

hCG+FSH로 조합하여 첨가된 성숙배양액에서 36시간 성숙 시킨 다음 수정배양액에서 caffeine으로 처리된 정자와 20시간 수정시킨 후의 체외수정율을 조사한 결과는 **Table 6**과 같았다.

**Table 6. Number of follicles and recovered ovum on the treatment of hormones.**

Hormones	No. of oocyte matured	No. of oocyte penetrated				Fertilization rate (%)
		1 PN+ Swollen head	2 PN	>2 PN(%)	Total(%)	
FSH+ GnRH	41(77.3)	13	23	5	36	87.8
FSH+hCG	44(80.0)	14	22	8	36	81.2
PMSG+GnRH	45(83.3)	18	21	6	39	86.7
PMSG+hCG	49(87.5)	26	18	5	44	89.7

Table 6에서 나타난 바와 같이 체외성숙 시 PMSG+hCG를 첨가하였을 때 89.7%로 가장 높은 수정율을 나타냈다. 이미 나타낸 바와 같이 체외성숙율이 PMSG+hCG 첨가구에서 가장 높게 나타났기 때문에 성숙율과 수정율간에는 정의 상관관계가 나타났다.

본 연구에서 얻어진 수정율을 보면 Yoshida 등 (1990)이 PMSG와 hCG를 첨가한 배양액에 체외성숙시킨 난포란의 정상수정율 보다는 약간 높았으며, Illera 와 Petters(1993)가 성숙배양액에 LH, FSH 및 pPPL을 첨가하여 성숙시키고 체외수정시켰을 때의 수정율과 Kikuchi 와 Nagai(1993)가 LH와 FSHDML 첨가에서 36시간 성숙시킨 후 정소상체 미부 동결정자와 수정시켰을 때의 정자침입율과 수정율을 보고한 결과와는 유사한 성적이었다. 그러나 Funahashi 등(1993)이 PMSG, hCG 및 estradiol-17 $\beta$ 의 첨가에서 20시간 성숙시키고 호르몬 무첨가에서 20시간 추가 배양후의 정자침입율 및 응성전핵형성율과, Yoshida 등(1992)이 hCG, PMSG, 및 estradiol-17 $\beta$ 의 첨가에서 성숙된 난포란의 정자침투율 및 응성전핵형성을 보고한 것보다는 다소 낮은 결과였다.

이와 같이 성선자극호르몬의 종류와 용량이 체외성숙 또는 체외수정에 미치는 영향에 대해서는 연구자들마다 다소 차이가 있으나 수정에서는 LH와 hCG가 크게 영향을 미치는 것으로 나타났다.(Kim 등, 1990). 한편 본 실험에서의 체외수정시 다정자 침입율은 Kwon 등(1990), Yoshida 등(1990), Park 등(1990)의 결과보다 현저하게 낮게 나타났다. 특히 본 시험에서 다정자침입율이 나타난 원인으로는 난자의 노화 및 정자 농도와 깊은 관계가 있는 것으로 사료되었다.(Hunter, 1991) 다정자침입은 수정 시 정자의 수정능획득조건 및 수정시간(Seizo 와 Toyoda, 1986) 등 여러 가지 조건에 영향을 받는 것으로 보고되어 있기 때문에 이러한 문제점들이 해결된다면 다정자침입율을



현저히 줄일 수 있을 것으로 사료되었다. 최근 Nagai와 Moor(1990)는 난관상피세포의 존재하에서는 체외수정 시 다정자침입율이 줄어든다고 보고한 바 있다.

산양의 예정시각 인공수정을 위해 비번식계절(5월~6월) 도래 시 Group I, II 및 III에서 각각 6두씩에 대해 수정한 결과는 Table 7과 같았다.

**Table 7. Kidding(conception) rate after fixed time AI(artificial inseminatiobn)**

Group	No. of goat inseminated	Conception rate (%)	Kidding rate (%)	Litter Size (Mean)
I	6	3 (50.0)	3 (50.0)	1.3
II	6	5 (83.3)	4 (66.7)	1.5
III	6	4 (66.7)	3 (50.0)	2.0

\* Group I : GnRH를 주사 ⇨ 1주일 후에 PGF<sub>2</sub>α + PG 600 주사 후 48시간 때에 채란(24시간 후 AI).  
 Group II : PGF<sub>2</sub>α 주사 후 2일 후 PG 600 + GnRH 주사 후 48시간 때에 채란(24시간 후 AI).  
 Group III : Ring-CIDR 장치 + GnRH 후 11일 후 PGF<sub>2</sub>α 주사하고, 24시간 후 FSH + GnRH 주사 후 24시간 때에 채란.(24시간 후 AI).

Table 7에서 보는 바와 같이 산양에 있어서 비번식계절의 분만율은 50.0 ~ 66.7% 로 계절번식성이 희박해진 것으로 나타났다. 비번식계절의 수태율이 50.0 ~ 83.3%인 것은 우리나라 재래산양의 번식계절성이 오랜 기간에 걸쳐 현저히 사라진 것으로 사료되었다.



**Fig. 10. 인공수정 후 3마리 분만한 어미 산양**

Fig. 10은 인공수정 후 태어난 새끼 산양과 어미 사진이며, 특히 새끼가 3마리 인 경우가 종종 발생되었으며, 3마리 새끼인 경우에는 젖먹이 경쟁으로 3마리 모두 폐사하는 경향이 높았으며, 노령 산양의 경우 자양 육성율이 매우 낮은 경향을 보였다. 한편 산양의 난포란 채란, 이식 등의 수술을 위해서 다음의 아외용 천막을 사용하기도 하였다.



< 산양 수정란이식 기술을 위한 간이 천막(바람 등에 의한 오염 방지) >

특히 야외용 천막은 가을, 겨울철에 바람을 막아주고, 산양의 시술에 매우 유용하였다.

### 3. 통계처리

실험에서 얻어진 결과는 SAS 9.1을 이용하여 최소 유의차 검정(Least Significant Different test; LSD test)과 General linearmodel(GLM)을 적용하여 Duncan의 multiple range test에 의하여 유의차( $p < 0.05$ )를 검정하였다.

## 제 2 절 품종간 교배조합에 의한 잠종 생산

### 1. 종간 교배 조합에 의한 수정란의 발생능 조사

#### 가. 시험축 확보 및 사양관리

시험에 사용된 산양(수컷 2, 암컷 30), 무플런(수컷 2)은 1년차에 구입한 개체를 연속적으로 사양관리하면서 시험에 공시하였고 누비양(암1, 수1)은 2차년도에 새로 구입하여 암 수 구분하여 사육하였으며, 3차년도에는 핵이식을 위한 산양을 30두 추가 구입하여 시험에 사용하였다. 공시 산양의 체중은 30 kg 전후의 산양으로 건강하다고 판단되고, 비임신으로 추정된 개체를 선발하여 바이오컬쳐(주)의 시험농장에서 사육하면서 내,외부 기생충 구제와 일정기간 동안 적응시킨 다음 본 연구에 사용하였다. 사양관리는 일반 관행법에 따라 볏짚 등(일부 수입 건조)을 자유 급식하여 사육하되, 농후사료는 1일 두당 200g씩을 추가 급여하고 식염과 물은 자유롭게 섭취토록 하였다.



### 나. 번식 및 비번식 계절에 대한 정액 성상 조사

2차년도 연구에서는 번식 및 비번식계절이 우리나라 재래 산양(흑염소)과 도입종인 누비양 및 무플런(Mouflon)의 정액 성상에 미치는 영향을 조사하기 위하여 번식(9~11월) 및 비번식계절(3~5월)에 대해서 수컷 재래산양, 누비양 및 무플런 2두에 대해 각각 전기자극정액채취기(Bailey Ejaculator, USA, Fig. 11)로 정액을 채취하여 정액성상을 조사하였다(Fig. 12). 정액 성상으로는 정액량, 농도 및 활력을 조사하였다.



Fig. 11. Portable electronic ejaculator for goat semen collection and Collection Instruments.



Fig. 12. Semen collection by portable ejaculator.

전기자극정액채취법으로 정액 채취 시 1~3차 분획으로 정액을 수집하여 분획별 정액 성상을 조사하였다. 정액채취 시 산양 정액은 정액량이 미미하므로 정액채취병에 미리 1ml씩의 Trish Berger 희석액을 분주해 둔 다음에 분획별로 정액을 채취하여 조사하였다. 번식 및 비번식계절이 정액 성상에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 8과 같았다.

Table 8. Effect of breeding- and non breeding season on goat

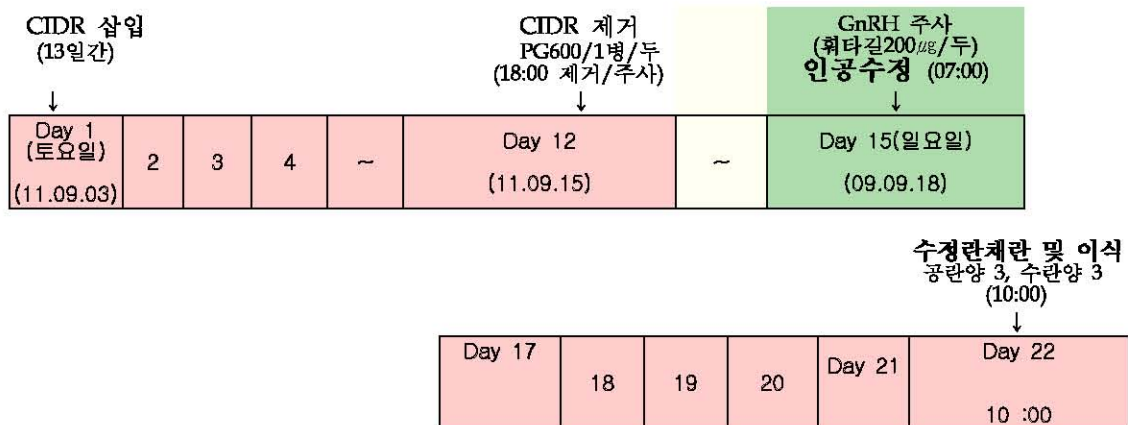
Characteristic	Breeding Season									Non-Breeding Season								
	Korean Native Goat			Nubian			Mouflon			Korean Native Goat			Nubian			Mouflon		
	V	C	M	V	C	M	V	C	M	V	C	M	V	C	M	V	C	M
Section I	0.59	0.97	81.7	0.32	0.30	61.7	0.20	0.13	31.7	0.40	0.45	73.3	0.18	0.36	11.7	0.08	0.24	21.7
Section II	0.51	0.88	83.3	0.25	0.44	73.3	0.14	0.25	53.3	0.32	0.88	81.7	0.15	0.27	73.3	0.05	0.25	53.3
Section III	0.89	0.50	66.7	0.38	0.40	46.7	0.09	0.28	36.7	0.78	0.80	56.7	0.12	0.40	36.7	0.11	0.12	16.7
Total (MSD)	0.7±0.20	0.8±0.25	77.2	0.3±0.06	0.4±0.07	60.6	0.1±0.05	0.2±0.08	40.6	0.5±0.07	0.7±0.23	70.6	0.2±0.03	0.2±0.07	40.6	0.1±0.03	0.1±0.08	31.6

\* Volume(V, ml), Concentration(C :  $\times 10^9$  cell/ml), Motility(M, %)

Table 8에서 보는 바와 같이 번식계절의 정액 성상이 비번식계절보다 일반적으로 양호하였으나 재래산양의 경우는 비번식계절과 번식계절간의 정액 성상 중 정액량에서 유의적인 차이 ( $p<0.05$ )를 나타내었으나 농도와 활력에서는 차이가 나타나지 않았다. 무플런(Mouflon)의 경우에는 다른 품종에 비해 전반적으로 정액 성상이 불량한 경향이 나타났다. 이러한 경향은 무플런이 양의 선조로 집단 생활력은 높으나 재래산양의 그룹 내에서 개별적 적응력이 낮아 위축된 것으로 사료되었다.

#### 다. 수정란 생산을 위한 다배란 처리

수정란 생산을 위한 산양의 다배란 처리는 1년차에 연이어 다배란처리가 난포의 발달 및 배란수에 미치는 영향을 조사하기 위해 산양 27두에 대해 각각 9두씩으로 그룹화 하여 비번식계절인(3~5월)에 **Group I**은 GnRH(휘타길 0.5ml)를 주사하고 1주일 후에 PGF<sub>2</sub>α (Lutelys 0.5ml)와 PG 600(0.5ml)\*\*을 주사하고 다배란을 유도하였으며, **Group II**은 Ring-CIDR 장치와 GnRH(휘타길 0.5ml)를 주사하고 11주일 후에 PGF<sub>2</sub>α (Lutelys 0.5ml)을 주사하고 24시간 후에 FSH(Folltropin V, 0.5ml)와 GnRH(휘타길, 0.5ml)를 병용 주사한 후 24시간 만에 채란하였다.(Fig. 13)



\* 이식 1시간 전 Flunixin 35mg 투여  
\* 과배란 처리 두수에서 수정란을 채란하여, 인공수정 미 실시 두수에게 수정란을 이식 함.

Fig. 13. 산양의 발정동기화 및 과 난포 생산(다배란) 처리 방법

비번식계절동안 다배란 처리된 산양으로부터 외과적으로 난포란 또는 수정란을 회수하였다. Group II의 방법으로 발정동기화된 산양(Fig. 14)은 CIDR 제거 후 60~72시간 때에 산양 또는 무플런정액으로 인공수정 하였다.(부록 1 - 2013~2015년 시험 추진 내역 참조)





특허명 : 성 호르몬 방출 장치 및 이를 이용한 동물 피임 및 발정 유도 방법(제1263916호, 2013.05.07등록)

**Fig. 14. 산양 발정동기화를 위한 Ring-CIDR 삽입 및 제거 장면**

#### 라. 체외수정을 위한 정자준비

개체별로 채취된 정자는 정장 내 수정능 억제물질을 제거하기 위하여 수정 기본 배양액(TCM 199 Earl's salt 용액 + sodium pyruvate 0.1mg/ml, glucose 0.55mg/ml, 60% calcium lactate 0.9mg/ml, dibekacin sulphate 100ug/ml, BSA 10mg/m, 10% FCS)으로 2~10배 희석하고 1,000rpm에서 0.5~1.0분간 원심분리하는 강제 swim up법으로 죽은 정자 및 이물질을 침전시킨 후 상층 액만 취하여 운동 정자의 농도가  $3 \times 10^7$  cell/ml로 조정된 후 0.5~1시간 전배양시켰다.

#### 마. 정자 농도에 따른 체외수정율

수정란의 발생 성공률을 높이기 위한 배양조건을 구명하기 위해서 정자 농도에 따른 체외수정을 실시하였다. 체외성숙이 끝난 산양 난포란을 수정배양액이 들어 있는 4-well dish에 각각 5개씩 성숙 난포란을 옮긴 후 동결 보존된 산양 정액을 용해하여 이 등(1995)의 방법에 의한 수정능획득처리(cafeine) 후 각 well 당 정자 농도가  $1.0 \sim 3.0 \times 10^6$  cell/ml 되게 주입하고 멸균 파라핀으로 피복한 후 6시간 동안 수정시켰다. 이 때 동결 용해된 정자의 활력은 60% 이상이었다. 체외성숙이 끝난 성숙난포란을 수정배양액이 들어 있는 4-well dish의 well 당 5~10개씩 옮긴 후 수정란발생 배양액에 수정능획득처리가 끝난 정자를  $1.0 \sim 3.0 \times 10^6$  cell/ml 되게 주입하고 멸균 파라핀 오일로 피복한 다음 38.5℃, 5% CO<sup>2</sup> incubator에서 5일 동안 배양시켜 배 발달을 관찰하여 조사한 결과는 Table 10과 같았다.

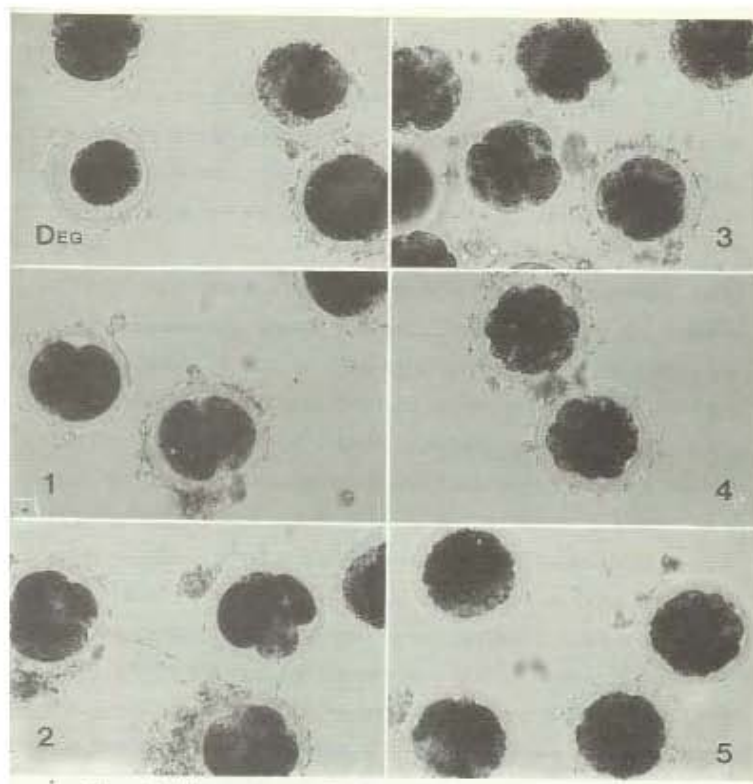
**Table 10. 정자농도에 따른 산양 난포란의 체외 수정율.**

Concentration (Cell numbers/ml)	No. of oocytes maturated	No. of fertilized oocytes	No. of cleaved embryos (%)				
			2-Cell	4-Cell	8-Cell	Morula	Total(%)
$1.0 \times 10^6$	25 (n=3)	12	4	4	2	2 (16.7)	12 (48.0)
$2.0 \times 10^6$	26 (n=3)	16	5	6	2	3 (18.8)	16 (61.5)
$3.0 \times 10^6$	26 (n=3)	18	6	7	1	4 (22.2)	18 (69.2)

산양 난포란의 체외수정율은 정자 농도가  $3.0 \times 10^6$  cell/ml일 때가 69.2%로  $1.0 \times 10^6$  cell/ml의 48.0% 보다 현저히 높았으며 수정 가능한 상실태(morula)까지의 발생도 높게 나타났다. 산양의 체외수정율이 낮은 원인은 제한된 난포란의 숫자에 의하여 추가적인 반복 실험 횟수가 적었기 때문이었으나, 본 실험에 의하여 수정란 배양 시스템의 안정성을 확인해 줄 수는 있었다고 사료되었다.

바. 다배란 처리별 수정란 발생

수정이 끝난 수정란을 발생배양액(sodium pyruvate 40ug/ml, glucose 1.0mg/ml, 60% sodium lactate syrup 3.7ul, dibekacin sulphate 100ug/ml, glutamine 0.14ug/ml 및 10% FCS가 포함된 TCM 199 Earl's salt 용액)에 옮겨 120시간까지 배양하였으며, 매 24시간마다 신선배양액으로 1/2씩 교환하고 발달단계를 조사하였다(Fig. 15). 다배란 처리시 Group 별 체외수정 후 5일간 배양한 수정란의 발달단계를 조사하였다. 이때 Group III의 경우에는 무폴런 정액으로 체외 수정하였으며 그 결과는 Table 11과 같았다.



1. DEG : One-cell or degenerated embryos(x100), 1. 2-cell, 2. 4-cell, 3. 8-cell. 4. 16-cell. 5. Morula≤  
**Fig. 15. Various stages and cleavage of embryos derived from in vitro fertilization.**

Table 11에서 보는 바와 같이 다배란 처리별(Group I, II, III) 회수된 난포란의 체외성숙 후 체외수정 시 체외발생율은 Group II에서 86.5%로 가장 높았다.



**Table 11. Effect of oocytes superovulated with various method (Group) on developmental potential after IVF(*in vitro fertilization*)**

Oocytes	No. of oocyte fertilized	No. of oocytes cleaved to						Cleavage rate (%)
		One cell (Degenerated)	2-cell	4-cell	8-cell	16-cell	Morula <	
Group I	34	7	8	13	4	2	0	27(79.4)
Group II	37	5	8	8	9	6	1	32(86.5)
Group III (Mufulon)	42	19	7	8	4	4	0	23(54.8)

## 2. 인공수정에 의한 교배 조합의 결과

다배란 처리 후 68~72시간 때에 인공수정한 후 5~6일째 공란양(供卵羊)으로부터 외과적으로 수정란을 회수한 결과는 Table 12와 같았다. 무플런 정액으로 수정한 공란양(3두)은 수정란이 회수되지 않았으며, 재래산양의 경우에는 G I의 경우 두당 평균 3.6개와 G II의 경우 4.7개의 수정란을 회수하였다. 회수된 수정란은 처리별 각각 3두의 수란 산양에 이식하였다.

**Table 12. Recovery rate(%) of embryo after superovulation and artificial insemination**

Treatment Method	Superovulation	Semen used to AI	Mean of embryo recovered	Non-return rate (%)
	Head of treatment			
Group I	4	Native Goat	3.6	1 head were non-pregnancy
Group II	6(3)	Native Goat	4.7	3 head were non-pregnancy
Group III	3	Mufulon	-	All treatment(3) were non-pregnancy



**Fig. 16. 규모화 인공수정으로 태어난 새끼 산양들**

본 시험에서 예정시각 인공수정(3 ~6두 그룹) 후 채란되지 않은 처리별 각 3두에서 Group I과 Group II에서 각각 3두 및 1두에서 분만이 이루어졌다. 전체 9두 중 4두가 분만되어 44.4%의 분만율을 나타내었다. 분만된 어미들은 분만 예정일(수정 후 150일)  $\pm$  2일 이내에 분만이 이루어졌으며(Fig. 16), 평균 임신기간은 151.6일(n=13)이었다.

## 제 3 절 산양의 수정란이식 기술 확립

### 1. 산양의 수정란이식 기술

#### 가. 질경법에 의한 비외과적 수정란이식

질경법에 의한 수정란이식 방법은 Fig. 17과 같이 먼저 보정된 산양의 후구를 높여서 시술자가 자궁경관을 용이하게 관찰 할 수 있도록 하였다. 경관 관찰이 잘 될 수 있도록 헤드라이트를 착용하여 시술하였다(없는 경우에는 보조자가 질 내부로 빛을 비추어 주었음).



Fig. 17. 산양 수정란의 비외과적 이식(질경법)

#### 나. 외과적 수정란이식 기술(수술)

외과적으로 산양 수정란을 이식하기 위해서는 먼저 이식할 상실배 이상의 수정란을 2개씩 0.25ml 스트로우에 장진하여 준비한 다음(Fig. 18) 마취 후 수술에 의해 절개 및 적출된 자궁의 선단부에 18G blunt needle로 자궁 내부로 펀치(구멍)을 낸 후 준비된 수정란 스트로우르 주사기 선단의 연결관에 연결시키고 미리 구멍을 낸 자궁 선단부에 수정란이 들어있는 스트로우를 삽입하여 수정란을 주입하였다(Fig. 19).

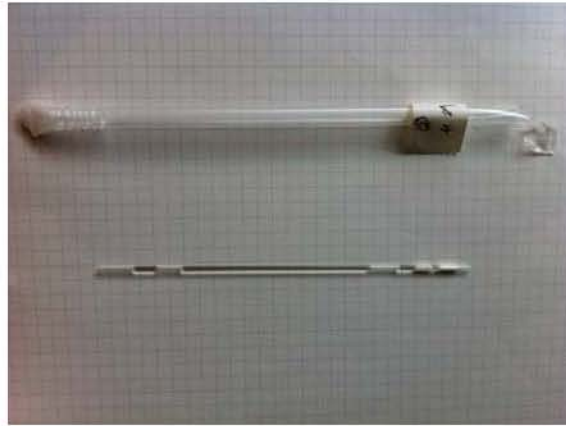


Fig. 18. 주입전 수정란의 스토로우 내 장전(준비)



자궁 선단 천공(좌) 및 복제 수정란 주입(우)  
 Fig. 19. 자궁 선단 내 수정란의 이식(주입)

## 2 교배 조합 수정란의 이식 결과

암컷 재래산양의 난포란에 무플런 정액으로 체외수정시켜 생산된 수정란 또는 인공수정 후 체란된 수정란을 다른 재래산양의 암컷에 이식시킨 결과는 Table 13 및 Fig. 20과 같았다.

Table 13. Result of transfer embryo fertilized at in vivo- and in vitro in goat.

No. of Embryo	Embryo transfer				
	No. of treated (Head)	No. of embryo transferred per Head	No. of Head with estrus returned	Conception Rate(%)	Parturition Rate(%)
In Vitro Fertilized	3	3.0	1	66.7	1 (33.3)
In Vivo Fertilized	4	4.0	1	75.0	1 (25.0)





Fig. 20. 교배조합 수정란으로 생산된 산양 새끼들

Table 13 및 Fig. 20에서 보는 바와 같이 체내 수정된 수정란 이식에서는 3두 중 1두가 쌍자를 분만하였으며, 체외수정된 수정란이식에서는 4두 중 1두가 1마리를 분만하였다. 본 연구에서 무푸른 정액으로 인공수정(또는 교배) 및 수정된 수정란으로 태어난 자양은 포유 중에 폐사하는 경향이 많았다.

## 제 4 절 핵이식 수정란(복제)의 생산 및 이식 기술 확립

### 1. 제태산양 기반 난자로부터 핵이식 수정란 생산 기술 확립

기본적으로 산양의 복제수정란 생산 및 이식은 Fig. 21과 같이 실시코자 하였다. Fig. 21에서 보는 바와 같이 인공수정기법과 동일하게 호르몬 처리에 의한 발정 및 다 난포발달을 유도하고, 채란(난포란 회수)하여 체외 성숙시킨 체외수정란을 생산하기 위해 체외수정을 시키거나 복제수정란 생산을 위해 성숙 난자로부터 수핵란 핵제거 - 공여세포 핵 주입 - 세포 융합 - 복제 수정란의 체외배양을 거치게 하였다.

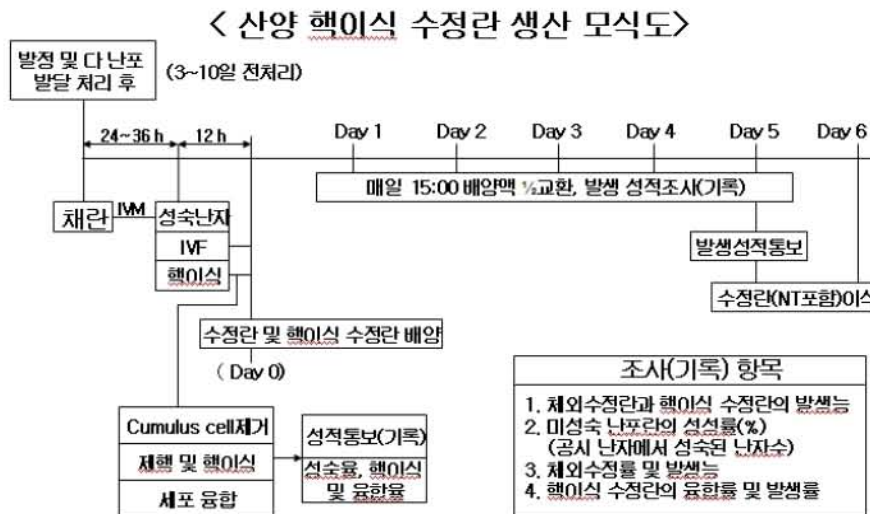


Fig. 21. Flow charte for production of cloned embryos in goat.



### 가. 복제 수정란 생산을 위한 공여해 세포 준비

산양의 복제수정란을 생산하기 위하여 공여해으로는 Fig. 22와 같이 재래산양, 유산양 및 무플런(누비양 추가)의 귀에서 체세포를 채취하였다. 이때 각 개체를 마취없이 보정하고 채취할 귀 부분을 베타딘으로 소독하고 제모한 후 70% 알콜 솜으로 3~4회 추가 소독한 다음 메스 또는 편치로 약 직경 5.0mm 정도의 넓이로 절개(또는 편칭)한 다음 2-3회 생리식염수로 세척한 후 생리식염수 용액에 담아 실험실까지 운반하였다. 운반된 귀 조직은 다시 PBS로 2-3회 세척한 후 세절하고 멩개어 부유액과 덩어리를 버린 후 침전된 아주 작은 조직(세포피)을 대상으로 분리된 세포의 회수를 위해 복합효소(CollagenaseIV, Hyaluronidase, Trypsin, 2.5 mg/mL)로 90분간 처리하였다. 회수된 세포의 안정적 확보를 위해 일반적으로 동물 세포의 배양에 사용되는 DMEM-S (Dulbecco Modified Eagle Medium with 2 mM L-glutamine, 0.1 mM b-mercaptoethanol, 100 U/mL of penicillin, and 100 µg/mL of streptomycin) 배양액에 FBS 10%(v/v)를 첨가하여 37℃에서 2주간 배양하였다. 귀 조직으로부터 회수된 세포를 상기 배양조건으로 배양한 결과 doubling time은 약 1.5일(생존율 95%)이었으며, 귀 세포의 동결 보존액은 기본적으로 DMEM (for STO Cell)과 FBS, DMSO를 혼합하여 사용하였다. 동결 보존액은 1 L 기준으로 DMEM Powder를 5차 증류수(600-700 mL)에 녹인 다음, NaHCO<sub>3</sub> 3.7 g을 넣고 교반한 후, 5차 증류수로 나머지 volume 1 L를 맞추고 최종 교반하였다. 교반된 DMEM에 L-glutamine 12 mL, Penicillin/streptomycin 12 mL, 2-MercaptoEthanol 8 µL를 각각 첨가하고, 0.2 µm 필터디스크로 Filtering하였다. Filtering 후 FBS 84 mL을 첨가하였다. 귀 세포 동결 시에는 추출한 세포를 배양액(DMEM)에 잘 혼합하여 준비한 후 DMSO : DMEM (for STO Cell) : FBS의 비율을 1 : 3 : 1로 혼합한 최종 동결 보존액[즉, 20% DMSO, 60% DMEM (for STO Cell), 20% FBS로 구성됨]과 세포 부유액을 1 : 1 비율로 섞어준 다음 동결하였다. 따라서, 최종 동결 보존액의 구성은 10% DMSO, 10% FBS, 80% DMEM이었다. 일반적으로 동결보존 시 -80℃ Deep Freezer에 overnight(최소 2시간 이상) 냉동 보관 후 -196도 액체질소 내에 침지하여 동결 보존하였다. 동결 보존 tube (vial)는 1.8 mL cryo vial을 사용하였으며, vial당 세포수가 1.0-5.0 X 10<sup>6</sup> cell/mL되도록 하여 1mL씩 담아서 동결 보존하였다 (Fig. 23.)

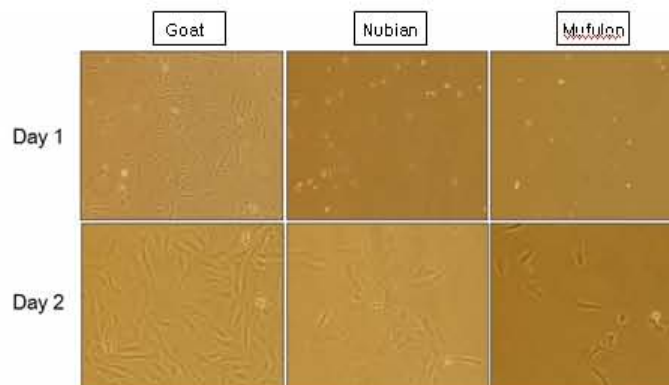


Fig. 22. Ear cell recovered from Korean native goat, nubian and mufulon for production of cloned embryo.

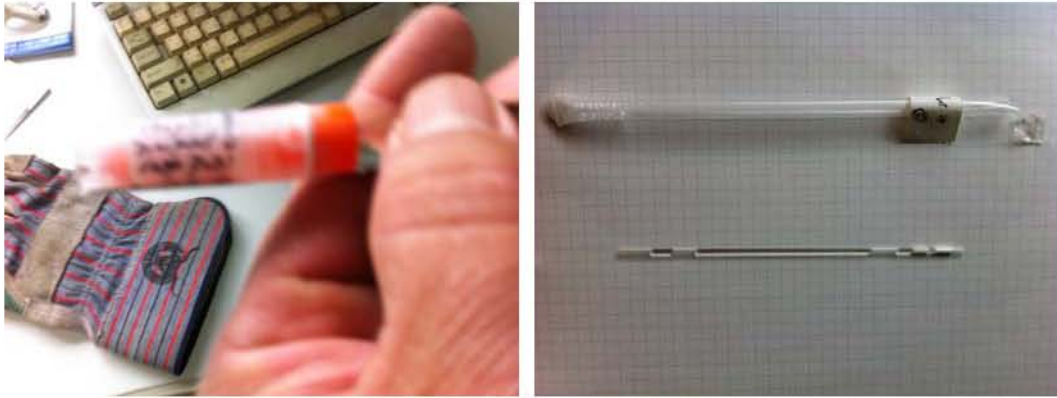


Fig. 23. 동결보존을 위한 공여핵의 처리

#### 나. 복제 수정란 생산을 위한 난포란 준비

1차 년도에 이어 2, 3차년도에서도 같은 방법으로 난포란을 회수하였다. 각 3두의 경산 산양으로부터 Group II 및 Group III과 같은 방법으로 다배란 처리하여 회수된 난포란을 36시간동안 성숙시켰으며, 성숙난자의 발생능을 비교하기 위해 성숙된 난포란의 1/2은 체외수정에 공시하였으며, 1/2는 복제수정란을 생산하기 위한 공시 난자로 사용하였다. 체외 성숙된 산양의 난자는 Fig. 24와 같았다.

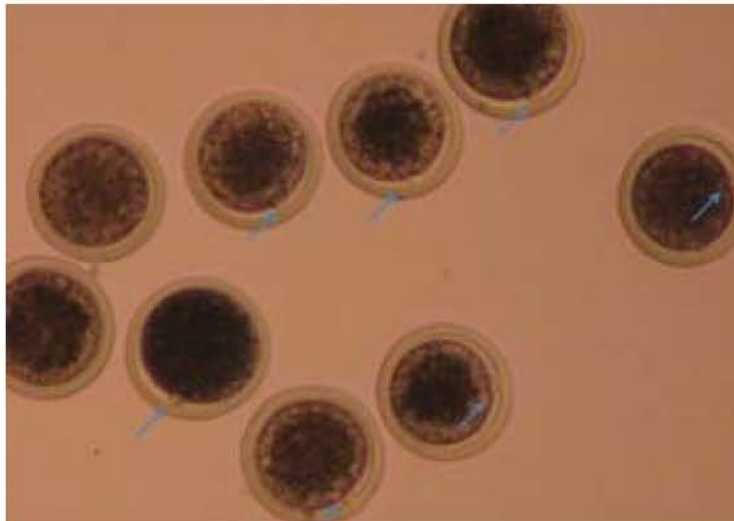


Fig. 24. 난구세포를 제거한 MII 단계의 산양 난자(극체 방출 상태)

#### 다. 복제 수정란 생산을 위한 세포 융합 결과

성숙 난자의 난구세포 제거를 위해 체외 성숙된 난자는 1mg/ml hyaluronidase가 들어있는 HEPES-buffered+난관관류액(100mM NaCl, 6.0mM KCl, 0.6mM MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O, 0.069mM Kanamycin, 20mM HEPES, 5mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.33mM PYRUVATE, 3.0mM L-lactic acid hemicalcium salt, 1mM glutamine, Eagle's basal medium essential amino acids 50×, MEM non essential amino acids 100×, 3mg/ml fatty acid-free bovine albumin) 500ml 용액에서 가

땀게 교반하여 난구세포 제거한 후 H-DSOF용액 (0.1mg/ml cold soluble polyvinyl acetate 10~30 KDa가 들어있는 )에 2번 세척하여 준비하였다. 난구세포가 제거된 성숙난자에서 polar body가 형성된 난자를 5ug/ml Hoechst 33342 + 7.5ug/ml cytochalasin B가 들어있는 H199-10 용액으로 5분간 염색한 후 20시간 때에 제핵하였다. 이때 동결보관 된 체세포를 용해하여  $2.5 \times 10^4$  cell/cm로 조정하고 17-20시간 배양한 후 PBS로 3번 정도 세척한 다음 DMEM/F12(0.5% FCS)배양액에서 4일 정도 배양하여 공여 세포로 준비한 다음 제핵된 난자의 세포융합을 위한 융합조건으로 1.5kv/cm, 45microsec, 2pulse로 추가하여 fusion을 실시한 결과는 Fig. 25와 같이 융합에 성공하였다. 산양 난포란으로부터 체외 성숙하여 제핵하고 핵이식하여 배양한 결과 Group III에서 세포융합율 및 발생율은 각각 39.6% 및 42.8%로 나타났다. (Table 14).

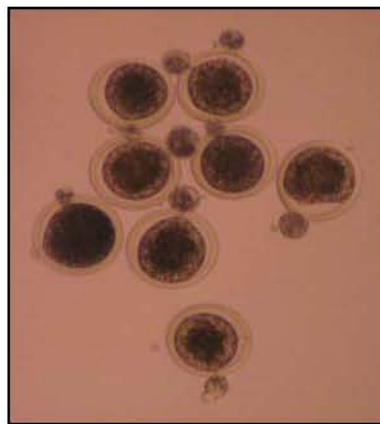


Fig. 25. 성숙 난포란으로부터 핵이 제거된 난자

이러한 결과로 융합 후 핵이 이식된 수정란이 정상적으로 발달하고 있음을 확인할 수 있었다.(Fig. 26)

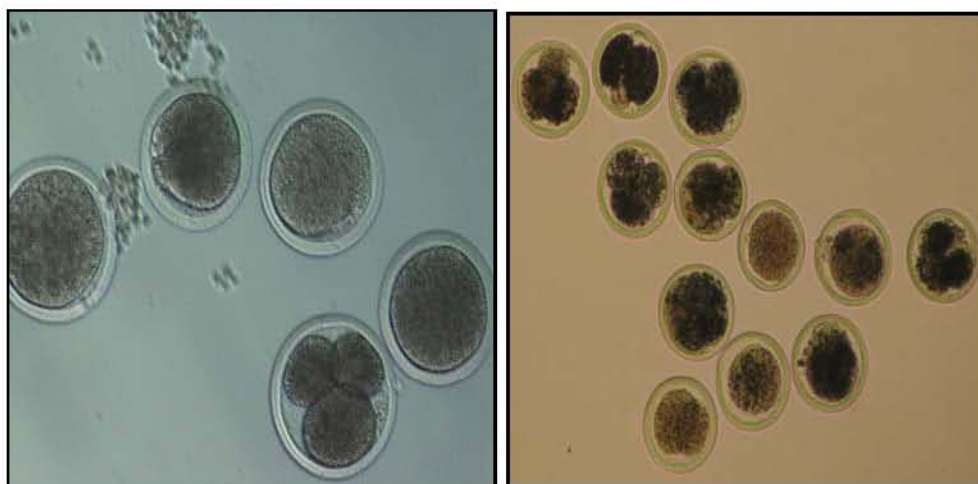


Fig. 26. 융합 후 5일까지 배양된 산양 핵이식 수정란



다. 핵이식(복제) 수정란 생산 결과

2차, 3차 년도에 핵이식(복제) 수정란의 생산 결과는 Table 12와 같았다.

Table 14. Result of production of cloned embryo in 2013~2015 year

Method of Treat.	No. of oocytes	MII (%)	Enucleated (%)	Fused (%)	Cleaved (%)	Remarks
G I	32	18	8	4	2	
G II	33	23	20	6	3	
G III	38	30	25	11	4	
<b>Total</b>	<b>103</b>	<b>71 (68.9)</b>	<b>53 (74.6)</b>	<b>21 (39.6)</b>	<b>9 (42.8)</b>	

Table 14에서 품종별 채란된 난포란을 체외성숙 후 핵이식한 결과 처음으로 세포 융합에 성공 하였다. Group 별 32, 33 alc 38개의 난포란을 성숙시킨 후 제핵하고 체세포 핵을 이식하였을 때 융합 율은 평균 39.6%였다. 이 중에서 발생에 성공한 비율(발생율)은 평균 42.8%였다. 2차 년도 이후에 핵이식 수정란 생산과정에 대한 고찰은 다음과 같았다.

- ① IVM 및 IVF 성적은 다소 높은 수준이었다.
- ② 체외수정 후 발생에서와 같이 발생성적이 낮은 것은 성숙난자의 발생 잠재력과 핵이식 시의 손상에 기인한 것인지는 분명하지 않았다,
- ③ Hyaluronidase 처리 후 cumulus cell 제거가 불편하였으며, 제핵 후 Fusion rate도 다소 낮았는데 이는 Oocyte membrane이 다소 강한 특징이 있었다.  
\* mucin 분비에 의해 작업이 순조롭지 못하였다.
- ④ 최종적으로 8개의 핵이식 수정란을 배양하였으며, 이식 후 분만에는 이르지 못하였다.

2차, 3차년도에 채란 시 소요된 시간이 다소 길었으며, 난포란을 보온병 내의 conical tube에 담아 옮길 때 보온병의 온도가 적절치 못하여(38~39℃), 회수된 난포란 품질이 낮은 것으로 사료되었다. 산양에 있어서 2차년도까지 주 실험은 매년 번식계절 도래 시기에 시험축 대부분을 동기화시켜 한꺼번에 채란하였던 관계로 연구 수행 중 한 순간의 실수에 의해 많은 부분의 실험처치가 거의 무의로 끝나게 되었으며 제실험 성적이 다소 나쁜 결과를 초래하는 원인이 된 것으로 여겨졌다. 산양 12두(Group I과 II)와 무플른 4두(Group III)에 대해 다 배란 처리하여 회수된 난자를 체외 성숙시킨 후 제핵하고 발생시킨 결과는 Table 15와 같았다.

**Table 15. Effect of oocytes superovulated with various method (Group) on developmental potential after fusion**

Treatment (No of goat)	No. of oocyte (MII)	No. of oocyte fusioned	No. of oocytes cleaved to						Cleavage rate(%)
			1-cell	2-cell	4-cell	8-cell	16-cell	Morula<	
Group I (6)	18	4	2		1	1			2(50.0)
Group II (6)	23	6	3	1	1	1			3(50.0)
Group III (Mifulon 4)	30	11	7		2	1	1		4(36.4)

Table 15에서 보는바와 같이 성숙 난포란으로부터 제핵 후 융합율은 29.6% 였으며, 핵이 융합된 수정란의 발생율은 36.4 ~ 50.0%였다. 4-cell 이상으로 발생된 복제수정란(42.8%)은 모든 처리에서 총 8개를 생산하였다.

## 2 산양의 핵이식 수정란(복제) 이식 기술 확립

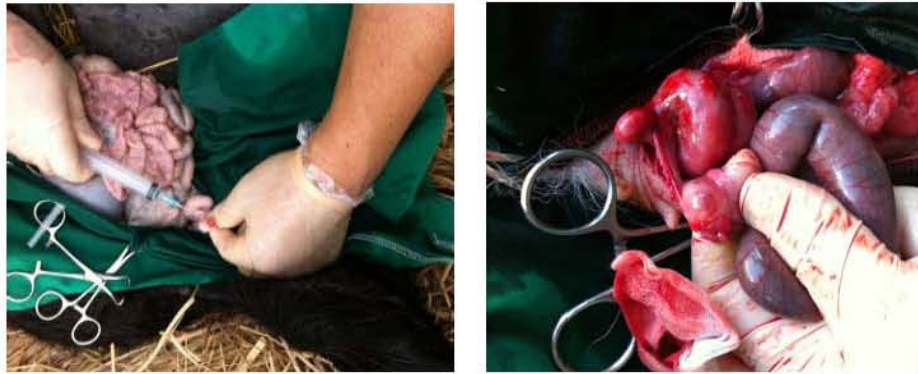
### 가. 외과적 산양 복제 수정란의 이식 방법 및 결과

산양 복제 수정란의 외과적 이식은 수정란이식 시 외과적 처리 방법에 준하여 실시 하였다. 먼저 생산된 4-세포기 수정란을 0,25ml 스트로우에 2개씩 Fig. 27과 같이 포장 및 장전하였다. 수정란이 포장된 스트로우를 1.0ml의 일회용 주사기에 고무튜브로 연결시켜 외과적으로 자궁을 적출시킨 후 자궁 선단 부위에 복제 수정란 2개씩 2마리에게 각각 이식시켰다(Fig. 28).



**Fig. 27. 산양 복제 수정란의 준비(장전)**





자궁 선단 천공(좌) 및 복제 수정란 주입(우)  
**Fig. 28. 자궁 선단 내 복제 수정란의 이식(주입)**

복제 수정란이 외과적으로 이식된 산양 2두 중 1두는 이식 후 재발 예정일에 발정 발견으로 임신에 실패하였으며, 나머지 1두는 정상적으로 사육(건강상태 양호)되고 있으나 임신에 따른 복부 팽만 상태로는 수태에 실패된 것으로 추정되었으며, 최종 보고서 제출 시점까지 분만되지 않은 상태이기 때문에 산자 생산에는 실패한 것으로 판단되었다.

**(나) 비외과적 사슴 복제 수정란의 이식 방법 및 결과**

산양 복제 수정란의 비외과적 이식도 앞선 설명의 비외과적 수정란이식 방법에 준하여 실시하였다. 비외과적 수정란이식기구는 Fig. 29와 같았다.



(질경, 랜턴, 자궁경관 확장 봉, 주입기, 시스)  
**Fig. 29. 비외과적 복제 수정란의 이식 기구**

산양의 복제수정란을 비외과적으로 이식할 경우에는 수정란 이식 방법에 준하여 실시하되, 먼저 Fig. 30과 같이 복제 수정란의 스트로우 내의 위치와 수량을 확인한 다음 0,25ml 수정란 주입기에 복제 수정란을 장전하고 질경범으로 이식하였다(Fig. 31).

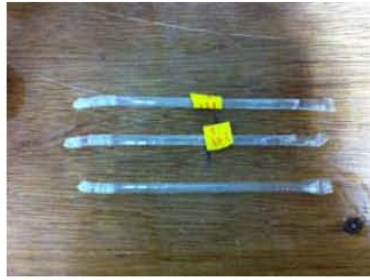


Fig. 30. 복제 수정란의 주입 전 준비 및 검사



Fig. 31. 복제 수정란의 장전 및 비외과적 주입(이식)

산양 복제 수정란의 비외과적 이식도 외과적 이식과 마찬가지로 2014년 10월 15일에 4-세포 기 복제수정란을 2개씩 각각 이식하였다. 분만예정일(임신기간 150일 기준)은 2015년 3월 12일 이었다. 임신이 조기에 알아낼 수도 있으나 임신진단을 위해서는 마취 보정 등에 의한 처치는 분만 가능성이 더욱 낮아지기 때문에 임신 진단 시술은 하지 않았으며 분만 예정일까지 사육 하였지만 산자 생산에는 성공하지 못하였다. 복제 수정란이 외과적으로 이식된 산양 2두 중 1두는 이식 후 제발 예정일에 발정 발견으로 임신에 실패하였으며, 나머지 1두도 정상적으로 사육(건강상태 양호)되고 있으나 임신에 따른 복부 팽만 상태로는 역시 수태에 실패된 한 것으로 판단되었다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 연도별 연구개발 목표의 달성도

#### 1. 1차년도의 연구개발 목표 및 달성도

- 과제명 : 산양에 있어서 생식세포의 포괄적 이용에 의한 규모화 인공수정, 수정란이식 및 핵이식 수정란 생산기술 확립

구분 (연도)	세부연구목표	달성도(%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (2012 ~ 2013)	○ 생식세포(정자 및 난자) 동결 기술 확립	100	- 산양 과배란 처리 후 회수 난포란을 이용한 체외수정을 조사
	○ 발정동기화에 의한 규모화 번식기술 확립	100	- 인공수정으로 교배시험 수행 (각 처리별 암컷 6)
	○ 종간 교배조합(인공수정)에 의한 종간 잡종 생산 가능성 검증	90	- 품종별 체외수정란의 발생능 조사 - 다배란 처리 인공수정 후 신선 수정란의 회수율 개선(50% 이상)
	○ 비번식계절에서의 인위적 수태 기술 확립	100	- Melatonin, Progesterone의 체내 삽입 발정 유지 기술 확립 - 발정탐지율 개선 연구(육안적 발정 관찰 vs 시정모 운용)

## 2. 2차년도의 연구개발 목표 및 달성도

○ 과제명 : 산양 및 유산양에서의 수정란이식 기술 확립

구분 (연도)	세부연구목표	달성도(%)	연구개발 수행내용
2차 연도 (2013 ~ 2014)	○ 중간 교배 조합 수정란의 발생능 조사와 이식에 의한 잡종 생산	100	- 수정란 생산을 위한 다배란 처리로 회수 수정란 수 개선 (5.0개/두 이상)
		80	- 중간 체외수정란 및 인공수정(신선) 수정란의 회수율 개선
		100	- 수정란이식에 의한 타 품종 순종 생산
	○ 재래산양 기반 중간 체외수정란 발생 능 비교	60	- 유산양, 무플런, 누비양 정자 IVF x 산양(우) 난자
		100	- 품종별 체외수정란의 발생을 조사
	○ 채란, 수정란 생산 및 이식 기술 확립	80	- 비외과적 채란 및 이식기술 확립(초음파기기 및 내시경적)
		100	- 외과적 채란 및 비외과적 채란의 성적 비교
		80	- 수정란이식에 의한 분만을 개선 : 30% 이상
	○ 재래산양 기반 난자로부터 핵이식 수정란 생산기술 확립	70	- 핵이식수정란의 발생을 조사 (발생 10% 이상 개선)

### 3. 3차년도의 연구개발 목표 및 달성도

○ 과제명 : 산양에 있어서 핵이식(복제) 수정란 생산기술 확립

구분 (연도)	세부연구목표	달성도(%)	연구개발 수행내용
3차 연도 (2014 ~ 2015)	○ 재래 산양을 근간으로 하는 종(種) 간 및 품종 간 잡종 생산	100	- 산양(백산양x흑산양), 유산양 및 무플런 등에서 품종간 교배 조합 (인공수정)에 의한 모색유전 양상 조사 (다양성 확립)
	○ 산양 및 유산양에서의 핵이식 수정란 생산기술 확립	100	- 재래산양 난자, 수정란 기반 중간 핵이식수정란 발생 능 비교
		70	- 유산양, 무플런, 누비양의 핵 및 체세포 배양(산양, 무플런 에서만 조사) - 핵이식란의 체외 발생 능 조사
	○ 품종 간 상호 복제 수정란 생산(이식)	100	- 핵이식수정란의 발생을 조사 (발생율 20% 이상 개선)
		100	- 재래산양 기반 난자로부터 핵이식 수정란 생산기술 확립 - 품종 간 상호 산양 및 유산양 복제 수정란이식 및 산자 생산



## 제 2 절 관련분야의 기술발전예의 기여도

### 1. 논문 발표 : 2 편(SCI급 1편 / 비SCI급 1편)

- Enhancemene of in vitro culture efficiency of mesenchymal stem cells derived from deer antlers. **2014.** Ki-Jung Kim, Hyung-Duk Yoo, Yong-Hee Kim, Yong-An Lee, Bang-Jin Kim, Mi-Seon Jung, Hyun-Gu Kang, Jang-Hee Lee, Buom-Yong Ryu. Tissue Engineering and Regenererrative Medicine. Vol. 11. Suppl. pp 16-23.
- **Effect of Breeding and Non-breeding Season on semen characteristics in Korean native Goat, Nubian and Mouflon.** **2014.** Jang-Hee Lee<sup>1)</sup>, Soon-Hwa Baek<sup>2)</sup>, Joo-HyungLee  
The Annual Scientific Meeting of the Endocrine Society of Australia and the Society for Reproductive Biology 2014 will be held from 24th - 27th August at the Melbourne Convention & Exhibition Centre.(Australia) p. 214-215.

### 2. 산업재산권

#### 1) 특허 : 6건(등록 6건)

구 분	지적재산권명	출원·등록번호 (년월일)	보유자	비 고
실용신안	탄성 부재를 포함하는 액체 주입 장치	제 1263914 호 (2011.01.11출원/2013.05.07등록)	바이오켈처(주)	등록
실용신안	역류 방지 부재를 포함하는 정액 주입 장치	제 1263915 호 (2011.01.11출원/2013.05.07등록)	바이오켈처(주)	등록
특허	성 호르몬 방출 장치 및 이를 이용한 동물 피임 및 발정 유도 방법	제 1263916 호 (2011.01.11출원/2013.05.07등록)	바이오켈처(주)	등록
특허	정액의 품질 평가 방법 및 평가용 키트	제 1243287 호 (2011.01.11출원/2013.03.07등록)	바이오켈처(주)	등록
특허	녹용세포의 증식 촉진 방법 10-2012-0056109(2012. 5. 25)	10-1459674 (2014.10.31등록)	중앙대 산학협력단	등록
특허	탄성 부재를 구비한 약물 주사침 및 그 주사침을 포함하는 약물 주사기 10-2013-0069974 (2013. 6.18 출원)	10-1506129 (2015.3.20 등록)	공주대산협단, 바이오켈처(주)	등록

#### 2) 저서 : 1권

### 3. 학술발표 : 10편

- 1) 녹용세포의 효율적인 체외배양시스템 개발에 관한 연구. 2012. 김기중<sup>1)</sup>, 이용안<sup>1)</sup>, 김방진<sup>1)</sup>, 김용희<sup>1)</sup>, 하승정<sup>1)</sup>, 이주형<sup>2)</sup>, 이장희<sup>2)</sup>, 류범용<sup>1\*)</sup> 한국수정란이식학회지. 29(supl.) : 32.
- 2) 녹용세포 동결보존의 효율성 증진 기법 개발. 2012 김기중<sup>1)</sup>, 이용안<sup>1)</sup>, 김방진<sup>1)</sup>, 김용희<sup>1)</sup>, 정미선<sup>1)</sup>,

- 이주형<sup>2</sup>, 이장희<sup>2</sup>, 류범용<sup>1\*</sup> 한국수정란이식학회지. 29(supl.) : 33. - 베스트 포스트상 수상
- 3) 동해보호제가 산양 및 무폴런 정자의 동결융해 후 생존성(활력)에 미치는 영향. 2013. 이장희, 백순화, 이주형. 한국동물번식학회지. 37(supl.2) : 52. (건국대, 충주캠퍼스, 2013. 6. 20~21)
  - 4) 사슴의 발정 및 다배란 처리방법이 인공수정 후 수정란 회수율과 수태(분만)율에 미치는 영향 (P051). 2013. 이장희, 백순화, 이주형. The 13th International Symposium on Developmental Biotechnology "Trends in Animal Reproduction, Fertility and Development". Supl. p. 84. (2013. 10. 25~26. 충북대)
  - 5) 산양에 있어서 다배란 처리가 난소 반응 및 난자 생산에 미치는 영향(P052). 2013. 이장희, 백순화, 이주형. The 13th International Symposium on Developmental Biotechnology "Trends in Animal Reproduction, Fertility and Development". Supl. p. 85. (2013. 10. 25~26. 충북대)
  - 6) **Effect of Breeding and Non-breeding Season on semen characteristics in Korean native Goat, Nubian and Mouflon.** 2014. *Jang-Hee Lee<sup>1)</sup>, Soon-Hwa Baek<sup>2)</sup>, Joo-Hyung Lee* The Annual Scientific Meeting of the Endocrine Society of Australia and the Society for Reproductive Biology 2014 will be held from 24th - 27th August at the Melbourne Convention & Exhibition Centre.(Australia)
  - 7) 번식 및 비번식계절이 재래산양, 누비양 및 무폴런 정액의 성상에 미치는 영향. 2014년. 이장희, 백순화, 이주형. 한국수정란이식학회 춘계학술대회지 p. 114-115.(P-74) (2014. 6. 5. 충남대 청심화홀.)
  - 8) Effect of Breeding and Non-breeding Season on semen characteristics in Korean native Goat, Nubian and Mouflon. 2014. *Jang-Hee Lee<sup>1)</sup>, Soon-Hwa Baek<sup>2)</sup>, Joo-Hyung Lee* The Annual Scientific Meeting of the Endocrine Society of Australia and the Society for Reproductive Biology 2014 will be held from 24th - 27th August at the Melbourne Convention & Exhibition Centre.(Australia)
  - 9) **Studies the Production of cloned Embryo by antler velvet cell of Deer.** 2014. *Jang-Hee Lee<sup>1)</sup>, Soon-Hwa Baek<sup>2)</sup>, Joo-Hyung Lee<sup>1)</sup>, Yong-Nan Xu, Nam-Hyung Kim<sup>3)</sup>.* 한국동물번식학회 춘계학술대회지. (일시 : 2014. 7. 4~5. 제주대학교 국제학술회의장)
  - 10) 산양에 있어서 비번식계절의 발정동기화 방법이 수태율에 미치는 영향. 2015. 이장희<sup>1)</sup>, 백순화<sup>2)</sup>, 김상환<sup>3)</sup>, 류춘열<sup>3)</sup>. 한국동물번식학회 춘계학술대회지 p. 114-115.(P-74).(일시 : 2015. 7. 2~3. 강원대학교 60주년 기념관).

#### 4. 박람회(전시회) 출전 : 2회



<2013 생명산업 DNA전 출전 : 코엑스>



<2012년 생명산업과학기술대전 : 서울 코엑스>

- 2012년 9월 20 ~ 22일 2012년 생명산업과학기술 대전(장소 : aT 센터)

\* 농업과학기술대상(농림수산식품부 장관상) 수상 함.

5. 박람회(전시회) 참관 : 1회



< 2014년 호주 멜브론 국제농업박람회(좌) 및 2013년 일본 가고시마 전자산업 엑스포 참관(우) >

<수상실적>

1. 2012. 9. 20 제15회 농업과학기술대상 장관 표창장 수상



<장관 표창장 수상(2012년) >

2. 2015. 8. 2 2015년 자랑스러운 한국인 대상(기술부문), 시사투데이 주최, 주관





# 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

## 제 1 절 연구개발 성과

### 1. 연구 목표 대비 성과(달성)

(단위 : 건수)

구분	특허		신제품				유전자원 등록	논문		기타 (학술발표)	
	출원	등록	품종 명칭 등록	품 수	생 입 신 교	품종보호		SCI	비SCI		
						출원					등록
1차년도	목표	1								1	
	달성		4							학술발표2	
2차년도	목표	1								1	
	달성		1							학술발표3	
3차년도	목표	1	1						1	1	
	달성		1							학술발표5	
계	목표	3	1						1	2	
	달성	1	6							10	

\* 연차별 연구성과 목표는 향후 연차평가 등의 정량적 평가지표로 활용됨



## 2. 연구성과 실적

### ○ 논문 및 학술발표

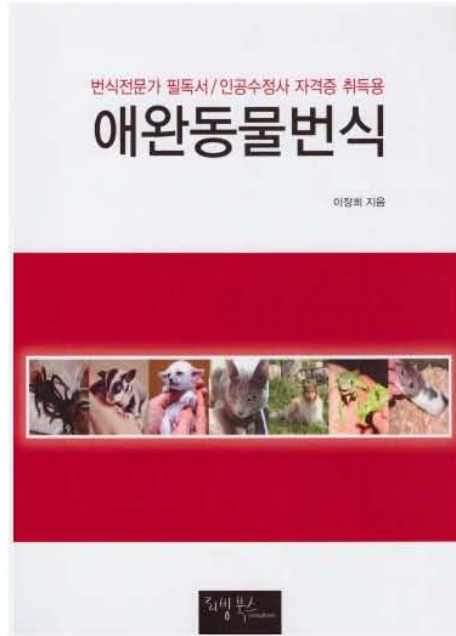
게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2012년	사슴에 있어서 급이식 발정동기화 및 다배란 처리가 난소 반응 및 난자 생산에 미치는 영향	이장희		백순화, 이주형, 류범용, 박성재, 허태영, 정영훈, 심호섭.	한국수정란식학회지.	29(supl.): 63.	국내	포스트
2012	사슴에 있어서 성선자극호르몬이 난포란의 발달에 미치는 영향	이장희		백순화	The 12th International Symposium on Developmental Biotechnology	Supl. p. 104.	(제주국제컨벤션센터)	(2012. 10. 25~26.)
2013	꽃사슴 난포란 생산을 위한 호르몬 처리방법이 난포 발육에 미치는 영향.	이장희		백순화	한국수정란식학회지.	29(supl.) : 69.		(단국대. 2013. 5. 24)
2013	꽃사슴 복제수정란 생산을 위한 핵이식 시 융합 조건이 핵이식 후 발생능에 미치는 영향	이장희		백순화	한국수정란식학회지	29(supl.) : 70.		"
2013	동결보호제가 산양 및 무플런정자의 동결융해 후 생존성(활력)에 미치는 영향	이장희			한국동물번식학회	37. No2	국내	
2014	번식 및 비번식 계절이 제라산양 수태 및 무플런정자의 생존성에 미치는 영향	이장희			한국수정란식학회	29. No.1	국내	
2014	Effect of Breeding and Non-breeding Season on semen characteristics in Korean native Gatt, Nubian and Muffon	이장희			The Annual Scientific Meeting of the Future Society of Australia and the Society for Reproductive Biology	24th - 27th August at the Melbourne Convention & Exhibition Centre.	(Australia)	
2014	Studies the Production of cloned Embryo by antler velvet cell of Deer	이장희			한국동물번식학회 춘계 학술대회지	2014.7. 4~5.	국내 (제주)	
2014	Enhancement of in vitro culture efficiency of nasal stem cells derived from deer antlers	Ki-Jun g Kim, Jang-H ee Lee			Issue Engineering and Re-generative Medicine	Vol. 11. Suppl. pp 16-23.	국제	
2015	산양에 있어서 비번식계절의 발정동기화 방법이 수태율에 미치는 영향	이장희			한국동물번식학회 춘계 학술대회지	2015.7.2~3.	국내 (강원대)	

○ 저술

- 애완동물 번식

(이장희 지음. 리빙북스 출판. 2015. 8. 20 초판 인쇄. 등록번호 : 제109-14-79437호)

ISBN 978-89-89727-96-5-93520



다. 특허 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
					2013.05.07	성호르본 빙출 장치 및 이를 이용한 동물 과임 및 발정 유도 방법	바이오컬쳐(주)	대한민국	제 1263916 호
					2013.05.07	탄성 부재를 포함하는 액체 입 장치	바이오컬쳐(주)	대한민국	제 1263914 호
					2013.03.07	정액의 품질 평가 방법 및 평가용 키트	바이오컬쳐(주)	대한민국	제 1243287 호
2013. (6.18)	탄성 부재를 구비한 약물 주사침 및 그 주사침을 포함하는 약물 주사기	바이오컬쳐(주)	대한민국	10-2013-0069974	2014. 10.31	농용세포의 증식 촉진 방법	중앙대 산학연 바이오컬쳐(주)	대한민국	제10-14 59674호
					2015. 3.20	탄성 부재를 구비한 약물 주사침 및 그 주사침을 포함하는 약물 주사기	바이오컬쳐(주)	대한민국	제10-14 59674 호

라. 기술료 징수 현황(기술이전)

번호	구분	지적재산권명	출원·등록 년월일	기술이전일	비고
1	특허	사슴정액 냉동보존액 및 이를 이용 하여 사슴정액을 냉동보존 하는 방법 및 사슴 인공수정 방법 (10-0414184-0000)	2003. 12. 23	2015.04.16	바이오켈처(주)→ 자체 사업화 기술이전
2	특허	녹용세포의 증식 촉진 방법	(2014.10.31등록)	2015. 6. 24	중앙대학교(바이오켈처) →(주)프로스테믹스

<붙임 1>

기술실시보고서									
(연번 : 0000)									
연구개발과제 명목	수원사	농림수산식품기술개발사업	연구과제번호	100020-3					
	연구과제명	무궁사슴농축액 또는 유용한 생리활성 성분의 생산과 병자의 수명연장의 기술 개발							
	연구기관명	농림수산식품 바이오벤처(주)	연구책임자	김갑배	김재기				
	연구책임자	2010. 7. 1	연구기간	2010. 7. 1~2014. 6. 30					
	연구예산액	정후준연방	기밀유양방	기타 ( )	계				
	400,000	100,000	800,000						
기술수시제외 사실과정을 기술	계약(발주)명	수출인양수정기술 기술이전							
	계약(발주)일	2010. 8. 30	계약(발주)지	2010. 8. 30~2012. 12. 31					
	지기명 목적	수출인양수정기술		생산액 증명		기술이전			
	~지기명 목적(중요성) 및 경우	명칭	번호	일자					
		가점액	대입금/수출액/농축액	거래금액	생산액/합계액				
	주 소	담당 책임자	전화번호	이메일					
	수령지번호	연락처							
	후자(발주)자	e-mail							
기술수시제외 사실과정을 기술	농림수산식품기술개발사업 제22호 2차								
기술료	정액기술료	계정기술료		기타 요건					
	잔여(발주)액	잔여(발주)액	잔여(발주)액	잔여(발주)액					
	계				계				
기타특이사항									
<p>국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제22조 제2항에 따라 위와 같이 기술실시제외가 체결되었음을 보고합니다.</p> <p>붙임 1. 기술실시제외서 자본 1부(기술이전서).</p> <p>2015년 4월 16일 농림회사법인 바이오켈처(주) [인인] 농림수산식품기술기획평가원장 귀하</p>									

기술수시보고서									
(연번 : 0000)									
연구개발과제 명목	수원사	농림수산식품기술개발사업	연구과제번호	110020-3					
	연구과제명	무궁사슴농축액 또는 유용한 생리활성 성분의 생산과 병자의 수명연장의 기술 개발							
	연구기관명	농림수산식품 바이오벤처(주)	연구책임자	김갑배	김재기	김재기			
	연구책임자	2010. 7. 1	연구기간	2010. 7. 1~2014. 6. 30					
	연구예산액	정후준연방	기밀유양방	기타 ( )	계				
	400,000	100,000	500,000						
기술수시제외 사실과정을 기술	계약(발주)명	농축액의 생산 증명							
	계약(발주)일	2010. 8. 30	계약(발주)지	2010. 7. 01~2014. 06. 30					
	지기명 목적	특허		생산액 증명		기술이전			
	~지기명 목적(중요성) 및 경우	명칭	번호	일자					
		가점액	(주)프로스테믹스	거래금액	생산액/합계액	특소기법			
	주 소	서울시 강남구 테헤란로 109	대표자	김갑배					
	수령지번호	20-강-10321	연락처	02-640-2918					
	후자(발주)자	e-mail ysk@prostemix.com							
기술수시제외 사실과정을 기술	이명희(주)장성 (주)장성 (주)장성(주)로 기술료 100% 지급								
기술료	정액기술료	계정기술료		기타 요건					
	잔여(발주)액	잔여(발주)액	잔여(발주)액	잔여(발주)액					
	2015. 6. 24	10,000,000원							
	계	10,000,000원			계				
기타특이사항	국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제22조 제2항에 따라 위와 같이 기술실시제외가 체결되었음을 보고합니다. <p>붙임 1. 기술실시제외서 자본 1부(기술이전서).</p> <p>2015년 8월 11일 농림회사법인 바이오켈처(주) [인인] 농림수산식품기술기획평가원장 귀하</p>								

마. 사업화 현황

사업화명	사업화내용	사업화 업체 개요				기매출액	당해연도 매출액	대출액 합계
		업체명	대표자	종업원수	사업화형태			

바. 인력활용/양성 성과

(1) 인력지원 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
2	1	1			2		2		

(2) 장·단기 연수지원 성과

장기 (2월 이상)		단기 (2월 미만)	
국내	국외	국내	국외

(3) 산업기술인력 양성 성과

프로그램명	프로그램 내용	교육기관	교육 개최회수	총 교육시간	총 교육인원

사. 경제사회 파급효과

산업지원 성과 (단위 : 건)				고용창출 성과 (단위 : 명)		
기술지도	기술이전	기술평가	합계	창업	사업체 확장	합계
		신기술인증				

신기술 명 : 돼지 정액 품질 간편 진단 기술

(인증기관 : 농림축산식품부장관 2015. 7. 2. 제21-023호)



신기술보유기관 : 농업회사법인 바이오컬쳐(주)

신기술 보유자 : 이 장 희



제 21-023 호



## 신기술 인증서

기 술 명 : 돼지 정액 품질 간편 진단 기술

기 관 명 : (주)바이오컬처

대 표 자 : 이장희

소 재 지 : 충남 천안시 서북구

인 증 번 호 : 21-023

유효기간 : 2015년 7월 2일부터 2017년 7월 1일까지

위 기술을 「농림수산물식품과학기술 육성법」 제12조의2에 따른  
신기술로 인증합니다.

2015년 7월 2일

농림축산식품부장관



### 3. 홍보 실적(박람회/전시회 및 학술대회 참가)

#### 가. 박람회(전시회) 출전 : 3회

- 2012년 9월 17 ~ 19일 농업과학기술대전(장소 : 서울 코엑스)

#### 나. 박람회 참관 : 1회

##### (1) 호주 농업 박람회 참관 내용

- 박람회 명 : 2015년 호주 국제농기계박람회
- 참가 목적 : 국제번식내분비 학술대회 참석
- 참가 기간 : 2014. 08. 26 ~ 08. 29

#### 다. 학술대회 참가 : 8회

##### (1) 한국동물번식학회

- 학술대회명 : 사단법인 한국동물번식학회 2015년 춘계학술대회
- 참가 목적 : 포스트 발표 1편(P-74)
- 참가 기간 : 2015. 07.02 ~ 07.03
- 장소 : 제주대학교 국제학술회의장

##### (2) 한국동물번식학회

- 학술대회명 : 사단법인 한국동물번식학회 2014년 춘계학술대회
- 참가 목적 : 포스트 발표 1편(P76)
- 참가 기간 : 2015. 07.04 ~ 07.05
- 장소 : 강원대학교 60주년 기념관

##### (3) The Annual Scientific Meeting of the Endocrine Society of Australia and the Society for Reproductive Biology

- 학술대회명 : 사단법인 한국동물번식학회 2014년 춘계학술대회
- 참가 목적 : 포스트 발표 1편(P76)
- 참가 기간 : 2015. 08.24 ~ 08.27
- 장소 : The Melbourne Convention & Exhibition Centre.(Australia)

##### (4) 한국수정란이식학회

- 학술대회명 : 사단법인 한국수정란이식학회 2013년 춘계학술대회
- 참가 목적 : 포스트 발표 2편(P027, P079)
- 참가 기간 : 2014. 06.05
- 장소 : 충남대 청심화홀

##### (5) 한국동물번식학회

- 학술대회명 : 사단법인 한국동물번식학회 2013년 춘계학술대회

- 참가 목적 : 포스트 발표 2편(P29)
- 참가 기간 : 2013. 06.20 ~ 06.21
- 장소 : 건국대학교 글로벌 캠퍼스, 컨벤션 센터

(6) 한국동물번식학회

- 학술대회명 : 사단법인 한국동물번식학회 2013년 춘계학술대회
- 참가 목적 : 포스트 발표 2편(P027, P079)
- 참가 기간 : 2013. 06.20 ~ 06.21
- 장소 : 건국대학교 글로벌 캠퍼스, 컨벤션 센터

(7) 한국수정란이식학회

- 학술대회명 : 2013년 한국수정란이식학회 춘계학술대회
- 참가 목적 : 포스트 발표 2편(P-41, P-42)
- 참가 기간 : 2013. 05.24
- 장소 : 단국대학교(천안캠퍼스) 제3과학관 국제회의장

(8) 국제 발생공학 심포지움

- 학술대회명 : 12차 국제 발생공학 심포지움
- 참가 목적 : 포스트 발표 1편(P-8)
- 참가 기간 : 2012. 10. 25 ~ 26
- 장소 : 서귀포 제주국제컨벤션센터

## 제 2 절 연구 성과 활용 계획

### 1. 연구성과 활용 목표 및 실적 대비

(단위 : 건수)

구분		기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표	1	2		1		
	달성	3			4		

## 2. 연구성과 활용 계획

### 가. 실용화 및 산업화 계획

- 자체 사업화(상품화) 계획 : 2(자체 기술 이전)

### 나. 기술 확산 계획

- 교육·지도 계획 : 2 (추가 계획 2)
- 홍보 계획 : 1 (전시회 참가)

### 다. 특허, 논문 등 지식재산권 확보계획

- 국제 특허 등록 :
- 특허 출원 : 1건 (국내)

### 라. 추가 연구계획 및 타 연구에 활용 계획

- 전 축종(소, 말, 산양, 돼지 등) 대상 복제동물 생산기술 확립
- \* 복제 산양 생산기술 확립 연구에 활용 중임

### 마. 산업화를 통한 기대 효과

#### (1) 경제적 파급효과

(단위 : 백만원)

항 목 \ 산업화 기준	1차년도 (2009)	2차년도 (2010)	3차년도 (2011)	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과	33,600	40,300	48,300	-	-	122,200
경제적 파급효과	157,500	157,500	157,500	-	-	472,500
부가가치 창출액	10,000	11,000	12,000	-	-	33,000
합계	201,100	208,800	217,800	-	-	627,700

※ 부가가치 창출액 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 수출효과, 브랜드가치 등 추정치

#### (2) 논문분석 측면 : 없음



### 3. 제품 및 시장 분석

#### 가. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

##### (1) 산업화 방향(제품의 특징, 대상 등)

- 산양 인공수정 및 수정란 이식의 산업화 기반 구축
  - 국내 산양 인공수정은 일부 단체 및 조합에서 제한적인 이용, 이를 확대하여 새로운 산양 개량 기반 개척
  - 수정란이식기반 마련을 통한 개량의 가속화 촉진
  - 국내 최적의 경제동물인 산양 수정란이식기술의 선도적 기반 확립

##### ○ 수정란 이식사업의 국내시장규모 및 발전방향

축종 (동물 명)	국내 시장 규모						특성	기타(근거) (임신가능 두수 기준)
	정액	보관료	수정료	수정란	보관료	시술료		
산양	40억	4억	100억	360억		200억	1% 시장 형성 시	1,200천두×2회×20,000원(정액) * 수정란 : 5~100만원/개
애완견	480억	48억	1,000억	3,600억		2,000억		
사슴	500억	50억	1,300억					
한우	700억	60억	1,500억	4,500억		4000억		
국내의 주요 수요처 현황		1. 농가 : 산양-5만4천가구, 소-35만가구, 사슴-1만3천가구, 말-463가구 * 축종별 사육두수(가임 암컷 수) : 2009.12. 축협조사월보(통계자료) - 소:2,356천두(1,200천두), 사슴:140천두(52천두), 2. 애완동물애호가(개 : 80만 가구, 1,860천 마리 사육, 임신가능 암컷-1,200천두) 3. 농업계 대학 및 연구소 - 연구재료 제공(정액, 체세포, 난자, 수정란, 특정미생물 및 종자 등) 4. 병원 - 산과병원(연구재료 제공), 이비인후과병원(불임시술자의 유전자원보존대행), - 기타 미생물관련 특정세포 보관대행(암세포, 특정병원균 등) 5. 동(식)물원 - 특정 동(식)물 유전자원 공급, 생산대행, 보관, 인공수정시술 1. 농업계 대학, 병원 및 연구소 - 연구재료 제공(정액, 체세포, 난자, 수정란 등) 2. 한국계 이민국가 : 미국, 캐나다, 멕시코 등 - 사슴산물 제공, 고국 향수 제공(수출 가능)						

##### (2) 산업화를 통한 기대효과

- 산양 수정란이식기술 보급 확대
  - 국내 농가당 평균 산양 사육두수 : 6.7두
  - 농가당가임 산양 보유두수 : 10개월령 이상의 가임 산양수(140,516)/사육농가수(48,000)=6.7두
  - 국내 기술에 의한 가임 산양의 20% 인공수정시 번식비용 절감액 : 128.6억원
  - \* 농가당 보유 가임 산양 수(6.7두)×농가수(48,000)×도입 수정란시술료(200천원)×20%

- 국내기술에 의한 가임 산양의 20% 수정란이식시 자양 생산에 의한 소득액 : 128억원
- 수입 산양의 대체효과 : 산양 수입에 의한 외화낭비 169억원 이상

○ 수정란 이식사업의 경제적 효과

(단위 : 백만원)

항 목 \ 산업화 기준	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과	33,600	40,300	48,300			
경제적 파급효과	157,500	157,500	157,500			
부가가치 창출액	10,000	11,000	12,000			
합 계	201,100	208,800	217,800			

※ 직접 경제효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 제품의 매출액 추정치

※ 경제적 파급효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통한 농가소득효과, 비용절감효과 등 추정치

※ 부가가치 창출액 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 수출효과, 브랜드가치 등 추정치

#### 4. 3P(특허,논문,제품)분석을 통한 연구추진계획

##### 가. 분석결과 향후 연구계획(특허, 논문, 제품 측면에서 연구방향 제시)

###### (1) 특허분석 측면

- 기존 발정동기화, 배란동기화, 핵이식 수정란이식 등의 특허기술은 산양 아닌 다른 대가축 및 소가축에 분야에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 산양에서의 번식능력의 향상과 계획번식의 가능성의 방향으로 연구를 추진하여 특허 등을 국내 및 국외에 출원할 계획임

###### (2) 논문분석 측면

- 본 연구과제에서는 현장 실용화방향으로 연구를 추진하여 "산양의 체내 난포란을 이용한 핵이식 후 발달 수정란의 성장효율 및 핵이식란 이식에 의한 산자의 생산과 발달에 관한 연구" 논문 등을 한국가축번식학회지, 한국수정란이식학회지 등에 게재할 계획임

###### (3) 제품 및 시장분석 측면

- 국내 및 국외시장 분석결과 최근 산양 제품의 판매 확대가 이루어지고 있으며 녹용, 인삼 등의 약제들과 함께 증탕된 제품들이 대부분을 차지하고 있다. 특히 수입육의 문제점 등을 보완하기 위해서는 수입육의 단속이 매우 절실한 실정이다. 본 연구과제에서는 관련농가 소득 향상을 위한 개량 및 수입육과의 차별화 연구를 추진하고자 한다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 제 1 절 박람회 참관

#### 1. 박람회 참가 목적

가. 박람회 명 : 2014년 호주 국제바이오산업 박람회

나. 참가 목적 : 농기계 및 바이오 장비 자료 수집

다. 참가기간 : 2014. 08.24 - 08.07

#### 2. 박람회 참가 시 수행 내용

가. 학술대회의 학술발표(포스터)

나. 바이오-농업 산업 관련 장비

## 제 7 장   참고문헌

- Asher GW, Gallagher DS, Tate ML. 1999. Tedford C Hybridization between spotted deer (*Cervus nippon*) and axis deer (*Axis axis*). *J. Hered.* 90(1):236-40.
- Asher GW, Scott IC, et al. 1997. Ultrasonographic monitoring of antral follicle development in red deer. *J. Reprod. Fert.* 111:91-99.
- Asher GW. 1993. Effects of an antiandrogen treatment on morphological characters and physiological functions of male fallow deer (*Dama dama* L.). *J Exp Zool.* 267(3):288-98.
- Badtram GA, Gaines JD, Thomas CB, et al. 1991. Factors influencing the accuracy of early pregnancy detection in cattle by real-time ultrasound scanning of the uterus. *Theriogenology.* 35:1153-1167.
- Bainbridge DRJ, Jabbour HN. 1997. Effect of pregnancy and exogenous interferon on synchronous pulsatile release of oxytocin and luteolytic prostaglandin  $F_{2\alpha}$  in red deer (*Cervus elaphus*). *J. Reprod. Fert.* 111:299-307.
- Berg DK, Asher GW (2003): New developments reproductive technologies in deer. *Theriogenology* 59(1):189-205.
- Berg DK, Thompson JG, Asher GW (2002): Development of in vitro embryo production systems for red deer (*Cervus elaphus*): Part 2. The timing of in vitro nuclear oocyte maturation. *Anim Reprod Sci* 70(1):77-84.
- Bo GA, Adams GP, Pierson RA, et al. 1995. Erogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology.* 43:31-40.
- Curran S, Ginther OJ. 1991. Ultrasonic determination of fetal gender in horses and cattle under farm conditions. *Theriogenology.* 36:809-814.
- Curran S, Kastelic JP, Ginther OJ. 1999. Determining sex of the bovine fetus by ultrasonic assessment of the relative location of the genital tubercle. *Anim. Reprod. Sci.* 19:217-227.
- Edmondson AJ, Fissore RA, Pashen RL, et al. 1986. The use of ultrasonography for the study of the bovine reproductive tract. I. Normal and pathological ovarian structures. *Anim Reprod. Sci.* 12:157-165.
- Eloranta E, Timisjarvi J, Nieminen M, Ojutkangas V, Leppaluoto J, Vakkuri O. 1992. Seasonal and daily patterns in melatonin secretion in female reindeer and their calves. *Endocrinology.* 130(3):1645-52.
- Esther Bender, Enda Bender. 1993. Search for a farm(1998). *Vet. Rec.* 133(13):322-3.
- Fissore RA, Edmondson AJ, Pashen RL, et al. 1986. The use of ultrasonography for the study of the bovine reproductive tract. II. Non-pregnant, pregnant and pathological conditions of the uterus. *Anim. Reprod. Sci.* 12:167-177.
- Flierman PA, Hogerzeil HV, Hemrika DJ. A, 1997 prospective, randomized. cross-over comparison of two methods of artificial insemination by donor on the incidence of conception: intracervical insemination by straw versus cervical cap. *Hum. Reprod.* 12(9):1945-8.
- Ghosh, P. and R. Roubin. 2000. Antler cartilage cells release factor that stimulate other cartilage cells to divide and make a new matrix. (Institute of bone and joint research, Australia). The



- 1st international symposium on antler science and product technology. pp. 27.(April 9 to 12. Banff Centre, Canada)
- Ginther OJ. 1986. Ultrasonic imaging and reproductive events in the mare. Equiservices, Cross Plains, WI. pp. 378.
- Gordon I. 1997. Reproduction in horse, deer and camelids. CAB international press. pp. 168-188.
- Helliwell RJ, Williams LM, 1994 The development of melatonin-binding sites in the ovine fetus. J. Endocrinol. 142(3):475-84.
- Huhtinen M, Rainio V, Aalto J, et al. 1992. Increased ovarian responses in the absence of a dominant follicle in superovulated cows. Theriogenology. 37:457~463.
- Izaike Y, Suzuki O, Shimada K, et al. 1991. Observation by ultrasonography of embryonic loss following the transfer of two or three embryos in beef cows. Theriogenology. 36:939~947.
- Jabbour HN, Asher GW, Smith JF, Morrow CJ. 1992. Effect of progesterone and oestradiol benzoate on oestrous behaviour and secretion of lateralizing hormone in ovariectomized fallow deer (*Dama dama*). J. Reprod. Fertil. 94(2):353-61.
- Jang-Hee Lee<sup>1)</sup>, Soon-Hwa Baek<sup>2)</sup>, Joo-Hyung Lee<sup>1)</sup>, Yong-Nan Xu, Nam-Hyung Kim<sup>3)</sup>. 2014. Studies the Production of cloned Embryo by antler velvet cell of Deer. 한국동물번식학회 춘계학술대회지. (일시 : 2014. 7. 4~5. 제주대학교 국제학술회의장)
- Jang-Hee Lee<sup>1)</sup>, Soon-Hwa Baek<sup>2)</sup>, Joo-Hyung Lee. Effect of Breeding and Non-breeding Season on semen characteristics in Korean native Goat, Nubian and Mouflon. 2014. The Annual Scientific Meeting of the Endocrine Society of Australia and the Society for Reproductive Biology 2014 will be held from 24th - 27th August at the Melbourne Convention & Exhibition Centre.(Australia)
- Kastelic JP, Bergfelt DR, Ginther OJ. 1990 Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. Theriogenology. 33:1269-1278.
- Kastelic JP, Pierson RA, Ginther OJ. 1990. Ultrasonic morphology of corpora lutea and central luteal cavities during the estrous cycle and early pregnancy in heifers. Theriogenology. 34:487-498.
- Kennaway DJ, Rowe SA. 1995. Melatonin binding sites and their role in seasonal reproduction. J. Reprod. Fertil., Suppl. 49:423-35.
- Kenneth G. Whitehead. The whitehead encyclopedia of deer. 1993. Swan Hill Press. P.29-32
- Kierdorf U. 1993. Circannual inter-relationships among reproductive hormones, gross morphometry, behaviour, ejaculate characteristics and testicular histology in Eld's deer stags (*Cervus eldi thiamin*). J. Reprod. Fertile. 98(2):471-80.
- Ki-Jung Kim, Hyung-Duk Yoo, Yong-Hee Kim, Yong-An Lee, Bang-Jin Kim, Mi-Seon Jung, Hyun-Gu Kang, Jang-Hee Lee, Buom-Yong Ryu. 2014. Enhancement of in vitro culture efficiency of mesenchymal stem cells derived from deer antlers. Tissue Engineering and Regenerative Medicine. Vol. 11. Suppl. pp 16-23.
- Kito S, Okuda K, Miyazawa K, et al. 1986. Study on the appearance of the cavity in the corpus luteum of cows by using ultrasonic scanning. Theriogenology. 25:325-333.
- Kolle R, Chaplin RE. 1973. The influence of age and season on the activity of the testes and epididymides of the fallow deer, *Dama dama*. J. Reprod. Fertil. 30(3):361-9.

- Laing JA, Heap RB. 1971. The concentration progesterone in the milk of cows during the reproductive cycle. *Br. Vet. J.* 127:xix.
- Lee, J.H. et al. 2000. Semen cryopreservation of three different deer breeders in Korea. The 1st international symposium on antler science. p.48-49.
- Lee, Jang-Hee, Soon-Hwa Baek, Joo-Hyung Lee, Beom-Yong Ryu, Ki-Joong Kim, Yong-Hee Kim, Seong-Jae Park, Tae-Yeong Huh, Yeong-Hoon Jeong, Ho-Sup Shim Technology Development of the Embryo Transfer and Production of Nuclear Transfer Embryo in Flower Deer and Elk. The 11th International Symposium on Developmental Biotechnology "Recent Trends in Reproductive Biotechnology". Supl. p. 33-34. (Oct. 21, Friday. 2011. Chonnam National University, Korea.)
- Lee. J.H. 2000. (April 9 to 12. Banff Centre, Canada) Effect of synchronization of estrus, AI timing and synchrony of ovulation on conception rate of farmed elk(wapiti) deer in Korea. The 1st international symposium on antler science and product technology. p.49-50.
- Lee. J.H. 2000. Changes of serum concentration of progesterone during the oestrus cycle, oestrus synchronization periods and early pregnancy of elk. The 1st international symposium on antler science. p. 51.
- Lincoln GA. Photospheric-melatonin relay in deer. 1998. *Acta Vet Hung.* 46(3):341-56
- Locatelli Y, Vallet JC, Huyghe FP, Cognié Y, Legendre X, Mermillod P (2006): Laparoscopic ovum pick-up and in vitro production of sika deer embryos: Effect of season and culture conditions. *Theriogenology* 66(5):1334-1342.
- Loudon AS, Curlewis JD. 1989. Cycles of antler and testicular growth in an aseasonal tropical deer (*Axis axis*). *J. Reprod. Fertil.* 83(2):729-38.
- Meydon MJ, Milne JA, Brinklow BR, Loudon AS. 1995. Manipulating melatonin in red deer (*Cervus elaphus*): differences in the response to food restriction and lactation on the timing of the breeding season and prolactin-dependent pelage changes. *J. Exp. Zool.* 273(1):12-20.
- Monfort SL, Asher GW, Wildt DE, Wood TC, Schpewe MC, Williamson LR, Bush M, Rail WF. 1993. Successful interuterine insemination of Eld's deer (*Cervus eldi tamin*) with frozen-thawed spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 99:459-465.
- Monfort SL, Brown JL, Wood TC, Wemmer C, Vargas A, Williamson L R, Wildt DE. 1993 Seasonal patterns of basal and GnRH-induced LH, FSH and testosterone secretion in Eld's deer stags (*Cervus eldi thamin*). *J. Reprod. Fertil.* 98(2):481-8.
- Monfort SL. 1993. Seminal vesiculitis and epididymitis in an Anglo- Nubian buck. *J. Reprod. Fert.* 99:459-465.
- Morrow CJ, Asher GW, Berg DK, Tervit HR, Poole PA, McMillan WH, Beaumont S, Hall DRH, Bell ACS. 1994. Embryo transfer in fallow deer. *Theriogenology.* 42:579-590.
- Muir PD, Sykes AR, Barrell GK. 1998. Changes in blood content and histology during growth of antlers in red deer (*Cervus elaphus*) and their relationship to plasma testosterone levels. *J. Anat.* 158:31-42.
- Newman RE, Foldes A, Maxwell CA, Rigby RD, Wynn PC. 1991. Identification of a seasonal elevation in daytime melatonin levels associated with the rut in fallow bucks (*Dama dama*): the effect of day length and exogenous melatonin. *J. Pineal. Res.* 11(3-4):101-10.

- Revol B, Wilson PR. 1991. Ultrasonography of reproductive tract and early pregnancy in red deer. *Veterinary Record*. 128:229-233.
- Rolf HJ. 1993. Effects of an antiandrogen treatment on the antler cycle of male fallow deer (*Dama dama* L). *J. Exp. Zool*. 266(3):195-205.
- Sauer MJ, Fonkes JA, Worsfold A, Morris BA. 1986. Use of progesterone II-glucuronide-alkaline phosphates conjugate in a sensitive microtitre-plate EIA of progesterone in milk and its application to pregnancy testing in dairy cattle. *J. Reprod. Fert*. 76:375-391.
- Siriaronrat B, Comizzoli P, Songsasen N, Monfort SL, Wildt DE, Pukazhenthil BS (2010): Oocyte quality and estradiol supplementation affect *in vitro* maturation success in the white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Theriogenology* 73(1):112-119.
- Suttie JM, Breier BH, Gluckman PD, Littlejohn RP. 1992. Webster JR Effects of melatonin implants on insulin-like growth factor 1 in male red deer (*Cervus elaphus*). *Gen. Comp. Endocrinol*. (1):111-9.
- Suttie JM, Lincoln GA, Kay RN. 1984. Endocrine control of antler growth in red deer stags. *J. Reprod. Fertil*. 71(1):7-15.
- Suttie, J.M. 2000. Deer velvet research : Does the data from growth mechanisms support the health promoting effects of the product?(Invermay Agricultural Centre, New Zealand). The 1st international symposium on antler science and product technology. pp. 26.(April 9 to 12. Banff Centre, Canada)
- Timothy L Biel. 1996. The deer family library Binding. Published by Creative Education. pp. 6-21.
- Tyler NJ. 1994. Role of gonadal hormones in the regulation of the seasonal antler cycle in female reindeer, *Rangifer tarandus*. *J. Reprod. Fertil*. 101(1):129-38.
- West NO. 1987. Annual cycle of lightweight and reproductive changes of farmed male fallow deer (*Dama dama*) and the effect of daily oral administration of melatonin in summer on the attainment of seasonal fertility. *J. Reprod. Fertil*. 79(2):353-62.
- Williams LM, Hannah LT, Kyle CE, Adam CL. 1996. Central melatonin receptors in red deer (*Cervus elaphus*). *Gen. Comp. Endocrinol*. 104(1):1-6.
- Yin Y, Tang L, Zhang P, Kong D, Wang Z, Guan J, Song G, Tang B and Z Li. 2012. Optimizing the condition for *in vitro* maturation and artificial activation of Sika deer. *Reprod Dom Anim* doi : 10.1111.
- Zomborszky Z, Zubor T, Toth J, Horn P. 1999. Sperm collection from shot red deer stags (*Cervus elaphus*) and the utilisation of sperm frozen and subsequently thawed. *Acta. Vet. Hung*. 47(2):263-70.
- 김기중, 이용안, 김방진, 김용희, 정미선, 이주형, 이장희, 류범용. 2012. 녹용세포 동결보존의 효율성 증진 기법 개발. *한국수정란이식학회지*. 29(supl.) : 33. - 베스트 포스트상 수상
- 김현중, 임경순, 진동일, 오성중, 양보석, 김진영, 김인철, 이장희, 손동수, 최선호. 2000. 소 난구세포를 이용한 복제수정란생산에 관한 연구. *한국축산학회분야학술발표*(PB20108).
- 류재원, 정영채, 김창근, 이장희, 손동수, 김인철. 2000. 농장사육 엘크사슴의 계절적 정액성상과 동결 정액이 수태율에 미치는 영향. *한국축산학회분야학술발표*(PB20114).
- 박수봉, 임석기, 우제석, 김일화, 이장희, 임재삼, 김인철, 손동수. 2000. PGF<sub>2α</sub> 또는 Ovsynch법으로 발정 동기화한 한우의 임신율. *한국축산학회분야학술발표*(PB20111).

- 박수봉, 임석기, 우제석, 김일화, 최선호, 이장희, 김인철, 손동수. 2000. 한우 수란우의 임신율에 대한 hCG 영향과 혈장 요소태질소 수준과의 관계. 한국수정란이식학회지1:115-120.
- 이장희 등. 2002. 동결정액 포장방법이 돼지정액의 성상 및 번식성적에 미치는 영향. 한국가축번식학회지 26:119-124.
- 이장희 등. 2002. 사슴의 발정동기화 및 인공수정기술 개발. 대한수의사회지 38(7): 626-637
- 이장희 등. 2003. 돼지 인공수정 효율 향상을 위한 정액품질 평가, 동결정액 생산 및 발정동기화기술 개발. 농촌진흥청 최종보고서.
- 이장희, 김상우, 김인철, 이장형, 서경덕, 김창근. 1996. 재래가축 및 경제동물의 동결정액 생산기술 개발에 관한 연구 II. 사슴. 1996년도 축산시험연구보고서 제 2권 종축개발부편. pp. 54-56.
- 이장희, 김인철, 손동수, 김현중, 김상우, 이동원, 김창근, 백순화. 1999. 사슴의 번식과 비번식계절에 있어서 정액의 성상 및 동결과정중 정자활력의 변화. 축산분야종합학술발표(P99135). p. 161.
- 이장희, 김인철, 손동수, 류재원, 김현중, 김상우, 유충현, 김창근, 백순화. 2000. 번식계절 직전 발정동기화 처리가 사슴의 수태율에 미치는 영향. 한국축산학회분야학술발표(PB20112).
- 이장희, 박충생. 1990. 한국재래산양의 임신기간중 혈중 progesterone 및 estrone sulphate 농도의 변화. 한국가축번식학회지. 14(3):213-221.(1998년 석사학위 논문)
- 이장희, 백순화, 이주형, 김기중, 류범용, 박성재, 허태영, 심호섭, 이종완. 2012. 사슴에 있어서 성선자극호르몬이 난포란의 발달에 미치는 영향. The 12th International Symposium on Developmental Biotechnology "Trends in Animal Reproduction, Fertility and Development". Supl. p. 104. (2012. 10. 25~26. 제주국제컨벤션센터)
- 이장희, 백순화, 이주형, 류범용, 김기중, 김용희, 박성재, 허태영, 정영훈, 심호섭. 2011. 사슴에 있어서 수정란 및 핵이식수정란 생산과 이식기술 개발. *Reprod Dev Biol.*, 35(2) : 44.
- 이장희, 백순화, 이주형, 류범용, 박성재, 허태영, 정영훈, 심호섭. 2012. 사슴에 있어서 급이식 발정동기화 및 다배란 처리가 난소 반응 및 난자 생산에 미치는 영향. 한국수정란이식 학회지. 29(supl.) : 63.
- 이장희, 백순화, 이주형, 류범용, 박성재, 허태영, 정영훈, 심호섭. 2010. 사슴에 있어서 다배란 처리가 난소 반응과 난자 및 수정란 생산에 미치는 영향. The 10th International Symposium on Developmental Biotechnology. Assisted Reproductive Biotechnology. p. 96.
- 이장희, 백순화, 이주형, 류범용, 박성재, 허태영, 정영훈, 심호섭. 2011. 사슴에 있어서 다배란 처리가 난소 반응과 난자 및 수정란 생산에 미치는 영향. 한국수정란이식학회지. 26(supl.) : 60.
- 이장희, 백순화, 이주형, 한아름, 정순우, 팍노일, 이후일, 서동철, 정대영, 김관국, 김범호, 박성재, 허태영. 2010. 엘크 사슴에 있어서 발정 및 배란동기화 처리 방법이 수태율에 미치는 영향. The 10th International Symposium on Developmental Biotechnology. Assisted Reproductive Biotechnology. p. 107.
- 이장희, 백순화, 이주형, 한아름, 정순우, 박달영, 팍노일, 서동철, 정대영. 2011. Phenol Red의 색상변화를 이용한 주입 전 간편 품질 평가 돼지 액상정액의 개발. 한국수정란이식학회지. 26(supl.) : 58.
- 이장희, 백순화, 이주형, 한아름, 정순우, 이후일, 서동철, 정대영, 김범호, 박성재. 2011. 엘크 사슴에 있어서 발정동기화 방법이 수태율에 미치는 영향. 한국수정란이식학회지. 26(supl.) : 59.
- 이장희, 백순화, 이주형, 허영남, 김남형. 2013. 꽃사슴 복제수정란 생산을 위한 핵이식 시 융합조건이 핵이식 후 발생능에 미치는 영향. 한국수정란이식학회지. 29(supl.) : 70. (단국대. 2013. 5. 24)
- 이장희, 백순화, 이주형, 허영남, 김남형. 2013. 꽃사슴 복제수정란 생산을 위한 핵이식 시 융합조건이 핵이식 후 발생능에 미치는 영향. 한국수정란이식학회지. 29(supl.) : 70. (단국대. 2013. 5. 24)

- 이장희, 백순화, 이주형. 2013. 꽃사슴 난포란 생산을 위한 호르몬 처리방법이 난포 발육에 미치는 영향. 한국수정란이식학회지. 29(supl.) : 69. (단국대. 2013. 5. 24)
- 이장희, 백순화, 이주형. 2013. 꽃사슴 난포란 생산을 위한 호르몬 처리방법이 난포 발육에 미치는 영향. 한국수정란이식학회지. 29(supl.) : 69. (단국대. 2013. 5. 24)
- 이장희, 백순화, 이주형. 2013. 꽃사슴 복제수정란 생산을 위한 핵이식 시 배양온도가 핵이식 후 발생능에 미치는 영향. 한국동물번식학회지. 37 supl. 2) : 117. (건국대. 충주캠퍼스. 2013. 6. 20~21)
- 이장희, 백순화, 이주형. 2013. 동해보호제가 산양 및 무플런 정자의 동결융해 후 생존성(활력)에 미치는 영향. 한국동물번식학회지. 37supl.2) : 52. (건국대. 충주캠퍼스. 2013. 6. 20~21)
- 이장희, 백순화, 이주형. 2013. 동해보호제가 산양 및 무플런 정자의 동결융해 후 생존성(활력)에 미치는 영향. 한국동물번식학회지. 37supl.2) : 52. (건국대. 충주캠퍼스. 2013. 6. 20~21)
- 이장희, 백순화, 이주형. 2013. 사슴의 발정 및 다배란 처리방법이 인공수정 후 수정란 회수율과 수태(분만)율에 미치는 영향(P051). The 13th International Symposium on Developmental Biotechnology "Trends in Animal Reproduction, Fertility and Development". Supl. p. 84. (2013. 10. 25~26. 충북대)
- 이장희, 백순화, 이주형. 2013. 산양에 있어서 다배란 처리가 난소 반응 및 난자 생산에 미치는 영향 (P052). The 13th International Symposium on Developmental Biotechnology "Trends in Animal Reproduction, Fertility and Development". Supl. p. 85. (2013. 10. 25~26. 충북대)
- 이장희, 백순화, 이주형. 2014. 번식 및 비번식계절이 재래산양, 누비양 및 무플런 정액의 성상에 미치는 영향. 한국수정란이식학회 춘계학술대회지 p. 114-115.(P-74) (2014. 6. 5. 충남대 청심화홀)
- 이장희, 백순화, 지달영, 박달영, 김관국. 2008. Methylene blue를 이용한 간편 정액진단키트와 이를 이용한 돼지 간편 품질진단 액상정액개발. 8차 발생공학 국제학술심포지움 p. 58-59.
- 이장희. 2001. 사슴의 동결정액생산, 인공수정 및 임신진단기법 개발. 2001. 농림부. 농림기술개발과제 최종보고서.
- 이장희, 김인철, 이동원, 류일선, 박성재, 서국현, 김상우, 유충현, 정경용, 백순화, 김창근, 손동수. 2001. 사슴의 발정동기화 및 Ov-Sync.방법에 따른 예정시각 인공수정 후 수태율 및 분만율. 발생공학 국제심포지움 및 학술대회 발표자료집. p. 66-67.
- 이장희<sup>1)</sup>, 백순화<sup>2)</sup>, 김상환<sup>3)</sup>, 류춘열<sup>3)</sup>. 2015. 산양에 있어서 비번식계절의 발정동기화 방법이 수태율에 미치는 영향. 한국동물번식학회 춘계학술대회지 p. 114-115.(P-74).(일시 : 2015. 7. 2~3. 강원대학교 60주년 기념관).
- 이장희<sup>1)</sup>, 백순화<sup>2)</sup>, 이주형<sup>1)</sup>, 김기중<sup>3)</sup>, 류범용<sup>3)</sup>, 박성재<sup>4)</sup>, 허태영<sup>4)</sup>, 심호섭<sup>5)</sup>, 이종원<sup>6)</sup>. 2012. 사슴에 있어서 성선자극호르몬이 난포란의 발달에 미치는 영향. The 12th International Symposium on Developmental Biotechnology "Trends in Animal Reproduction, Fertility and Development". Supl. p. 104. (2012. 10. 25~26. 제주국제컨벤션센터)
- 이장희<sup>1)</sup>, 백순화<sup>2)</sup>, 이주형<sup>1)</sup>, 류범용<sup>3)</sup>, 박성재<sup>4)</sup>, 허태영<sup>4)</sup>, 정영훈<sup>4)</sup>, 심호섭<sup>5)</sup>. 2012, 사슴에 있어서 급이식 발정동기화 및 다배란 처리가 난소 반응 및 난자 생산에 미치는 영향. 한국수정란이식학회지. 29(supl.) : 63.
- 허태영 등. 2007. The Effects of Administering Estradiol Benzoate together with Progesterone during the Growing or Static Phase of the Dominant Follicle in CIDR-Treated Lactating Dairy Cows. Journal Reproduction and development 53(3):591-596.



부록 1

< 연도별(2013년~2015년) 실험 추진 일정표 >

산양 규모화 인공수정 및 비번식계절의 발정동기화 처리 계획  
2013년 10월 추진 일정표 바이오원쳐(주) 작성(이장희)

일	월	화	수	목	금	토
		1	2	3	4	5
		- 액체질소 보충 - 산양 기계 번호 장과 (목종과 이요 장과) - 운비이요/장과기/목종	난포란배양액 제조 - 배양액 제조	Group II 처리 - Ring-CIDR 제거 : 9두 - GnRH 주사 : 9두 (황타권0.5ml) 주사 (오전 8시 ~)	CO2 Incubator 준비 : CO2 주문/예비가동	
6	7	8	9	10	11	12
		Group III 처리 - PGF2a 주사 (0.5ml/두) : 9두 (오전 8시 ~)	- PG600(0.5ml/두)+GnRH 주사 (황타권 0.5ml) 9두 (오전 8시 ~)	* 수술기구 및 약품 준비	- 채란 : 3두 (오전 10시 ~)	- AI : 3두 (오전 10시 ~)
13	14	15	16	17	18	19
		- Ring-CIDR 제거 : 9두 - PGF2a 주사 (0.5ml) : 9두 (오전 8시 ~)	- FSH(Folltropin0.5ml)+ GnRH 주사(황타권 0.5ml) : 9두 (오전 8시 ~)	- 채란 : 3두 (오전 8시 ~)		
				- AI : 3두 (오전 8시 ~) - ER : 3두(대리모) - in vivo embryos - in vitro embryos (오전 10시 ~)		
20	21	22	23	24	25	26
		ER : 3두(대리모) - in vivo embryos - in vitro embryos (오전 8시 ~)				
27	28	29	30	31		

\* G II : 제발에정일(발정확인) - 2013년 11월 7일(분만에정일 : 2014년 4월 7일-미분만)  
\* G III : 제발에정일(발정확인) - 2013년 11월 2일(분만에정일 : 2014년 4월 2일-미분만)

산양 규모화 인공수정 및 비번식계절의 발정동기화 처리 계획  
2014년 3월 추진 일정표 바이오원쳐(주) 작성(이장희)

일	월	화	수	목	금	토
						1
2	3	4	5	6	7	8
		- 시약주문(별첨 1)		산양정액 보존액 2차(제조) 및 채취기 준비		
9	10	11	12	13	14	15
		- 액체질소 보충	산양정액 보존액 2차(제조) 및 채취기 준비	- 산양정액 동결보존 * 2가지 처리 * 알코올 + 글란 5% vs 난황 * 얼지 동결정액도 동시 처리		
16	17	18	19	20	21	22
		Group I 처리 - GnRH 주사(9두) * 황타권(0.5ml) 주사 (17:00에 시작)			- 난포란배양액 제조 - 배양액 제조	
23,30	24,31	25	26	27	28	29
		- PGF2a 주사 (10ml/두) +PG600(0.5ml/두)9두 주사 (10:00에 시작)	* 수술기구 및 약품 준비	- 채란 : 3두 (오전 8시 ~)	- AI : 3두 (오전 8시 ~)	

- 산양 발정동기화 및 다 난포란 생산 처리방법 :  
G I : GnRH 주사 ⇒ 1주일 후 PGF2a+ PG 600 주사 ⇒ 48시간 후 난포란 채란 ⇒ 24시간후 인공수정  
G II : Ring-CIDR 장치후 11일째 제거 PGF2a주사 ⇒ 24시간 후 FSH+GnRH 주사 ⇒ 24시간후 채란 ⇒ 24시간후 인공수정  
G III : PGF2a 주사 ⇒ 2일 후 PG 600 + GnRH 주사 ⇒ 48시간 후 난포란 채란 ⇒ 24시간후 인공수정

산양 규모화 인공수정 및 비번식계절의 발정동기화 처리 계획  
2014년 4월 추진 일정표 바이오퀵처(주) 작성(이장희)

일	월	화	수	목	금	토
		1	2	3	4	5
	난포란배양액 제조(직접) 배양액 제조	수술기구 및 약품 준비	ET : 3두(대리모) - in vivo embryos - in vitro embryos (오전 8시 ~)			
6	7	8	9	10	11	12
				Group II 처리 - Ring-CIDR 장치 : 9두 - GnRH 주사 : 9두 - 워타길(1.5ml) 주사 (오전 8시 ~)		
13	14	15	16	17	18	19
20	21	22	23	24	25	26
	Ring-CIDR 제거 : 9두 PG600주사(1.5ml/두) : 9두 (오전 8시 ~)	FSH(Follitropin0.5mg)+ GnRH 주사(워타길 0.5ml) : 9두 (오전 8시 ~)	채란 : 3두 (오전 8시 ~)	- AI : 3두 (오전 8시 ~)		
27	28	29	30			
	수술기구 및 약품 준비	ET : 3두(대리모) - in vivo embryos - in vitro embryos - cloned embryos (오전 8시 ~)				

산양 난포란으로 부터 핵이식 수정란생산 계획  
2014년 10월 추진 일정표 바이오퀵처(주) 작성(이장희)

일	월	화	수	목	금	토
			1	2	3	4
				액체질소 보충	산양정의 보존액 1차 준비(제조)	
5	6	7	8	9	10	11
				* 폐사 예방 7주년 기념일	- 시약주분(별첨 1) - 중앙대/충북대 협의 및 검토 의뢰	* 중앙대 : 동결 산양 세포 협조 의뢰
12	13	14	15	16	17	18
	액체질소 보충		산양정의 보존액 2차(제조) 및 채취기 준비	- 산양정의 동결보존(2차 처리) * glycerol + 글리콜 5% vs 난황 * 폐지 동결정역도 동시 처리	난포란배양액 제조 의뢰 (충북대)	
19	20	21 (Group 1)	22	23	24	25
	산양 개체 번호 관리 (목줄과 이표 관리) - 준비 : 이표/양라기 목줄	O Group 1 처리 - GnRH 주사(6두) * 워타길(1.5ml) 주사 (17:00에 시작)	- CO2 incubator 준비 : O <sub>2</sub> 주분/메비가들	- 산양정의 동결보존(2차 처리) * glycerol + 글리콜 5% vs 난황 * 폐지 동결정역도 동시 처리	- 난포란배양액 제조(직접) - 산양세포 직접 배양 개시 - 충북대 산양세포 및 정액 전달 (배양액 인수)	
26	27	28 (Group 1)	29	30 (Group 1/2)	31	11/1(토)
		- 6두 PG <sub>2</sub> α 주사(10ml/두) + PG600(1.5ml/두) 2두 주사 또는 FSH 4두 주사 (10:00에 시작)	* 수술기구 및 약품 준비	- 채란 : 6두 (오전 8시 ~) * 채란 난자 충북대 배출 - Group 2 * PG <sub>2</sub> α 주사(10ml/두) : 6두		- Group 1 핵이식/IVF - Group 2 * PG600(1.5ml/두) + GnRH주사 : 6두 (워타길 1.5ml)

● 산양 발정동기화 및 다 난포란 생산 처리방법 :

- 1안 : GnRH 주사 ⇒ 1주일 후 PG<sub>2</sub> α + PG 600(또는 FSH) 주사 ⇒ 48시간 후 난포란 채란(번식계절 도래시) - Group 1, Group 5
- 2안 : PG<sub>2</sub> α 주사 ⇒ 2일 후 PG 600 + GnRH 주사 ⇒ 48시간 후 난포란 채란(번식계절 중에 실시) - Group 2, Group 3, Group 5

2014년 11월 추진 일정표 바이오켈쳐(주) 작성(이장희)

일	월	화	수	목	금	토
						1 - Group 1 핵이식/IVF - Group 2 * PG60(1.5ml/부) + GnRH주사 : 8부 (월타겟 1.5ml)
2	3 (Group 2) - 채란 : 5부 (오전 8시 ~) * 중북대 배송	4	5 - Group 2 핵이식/IVF	6 - Group 3 * PG60 주사(10ml/부) : 8부	7 (Group 1) - 수정란인수(중북대) - 미채란 1부 수정란이식(천안) (비외과적)	8 - Group 3 * PG60(1.5ml/부) + GnRH주사 : 8부 (월타겟 1.5ml)
9	10 (Group 3) - 채란 : 6부 (오전 8시 ~) * 중북대 배송	11 - Group 2 (수정란인수) * 미 채란 1부 수정란 또는 핵이식수정란 이식 (비외과적)	12 - Group 3 * 핵이식 및 IVF (성공/실패 확인)	13 - 산양 합식 : 12(8,2,우10)	14	15
16	17	18 - Group 3 (수정란인수) * 미 채란 2부 수정란 또는 핵이식수정란 이식 (비외과적)	19	20	21	22 - Group 4 * PG60(1.5ml/부) + GnRH주사 : 8부 (월타겟 1.5ml)
23/30	24 (Group 4) - 채란 : 6부 (오전 8시 ~) * 중북대 배송	25	26 - Group 4 * 핵이식 및 IVF (성공/실패 확인)	27 익월 12월 4일(화) 이식 여부 결정	28	29

\* 산양 동결 산양세포 인수(중양대) : 2012. 10. 16 예정

2014년 12월 추진 일정표 (바이오켈쳐(주) 제공)

일	월	화	수	목	금	토
	11/24	11/25	11/26	11/27	11/28	11/29
	- 채란 : 6부 (오전 8시 ~) * 중북대 배송	○ Group b 처리 - GnRH 주사(6부) * 월타겟(1.5ml) 주사 (17:00에 시작)	- Group 4 * 핵이식 및 IVF (성공/실패 확인 후 이식 결정)			
30	1	2 - Group 4 (수정란인수) * 미 채란 1부 수정란 또는 핵이식수정란 이식 (비외과적) - Group b (G2제처리) 6부 PG60 주사(10ml/부) +PG60(1.5ml/부)2부 또는 FSH 4부 주사 (10:00에 시작)	3	4 (Group 5) - 채란 : 8부 (오전 8시 ~) * 중북대 배송 - Group 6(G3 제처리) * PG60 주사(10ml/부) : 8부	5	6 - Group b 핵이식/IVF - Group 6 * PG60(1.5ml/부) + GnRH주사 : 8부 (월타겟 1.5ml)
7	8 (Group 6) - 채란 : 6부 (오전 8시 ~) * 중북대 배송	9	10 - Group 6 * 핵이식 및 IVF (성공/실패 확인)	11 (Group b) - 수정란 인수(중북대) - 미채란 1부 수정란이식 (비외과적)	12	13
14	15	16 - Group 6 (수정란인수) * 미 채란 2부 수정란 또는 핵이식수정란 이식 (비외과적)	17	18	19	20
21/28	22/29	23/30	24/31	25	26	27

2015년 산양 규모화 인공수정을 위한 발정 및 배란 동기화 처리 방법

**4월 추진 일정표** 마이오컬쳐(주) 제공(이경희)

일	월	화	수	목	금	토
						1
2	3	4	5	6	7	8
9	10	11	12	13	14	15
16	17	18	19 (Group 1) - PG, α 주사: 3.5-5ml/두 (Lutelyse) - PG600 주사 - 5ml/두 (17:00에 시작)	20	21 - 휘타길(GnRH) 주사 : 5ml(1행)/두 (17:00에 시작)	22 - 수산양 합사(1차) (오전 8시 ~)
23/30	24(Group 2) - PG, α 주사: 3.5-5ml/두 (Lutelyse) - PG600 주사 - 5ml/두 (17:00에 시작)	25 - 수산양 격리(1차) (오후 5시 ~)	26 - 휘타길(GnRH) 주사 : 5ml(1행)/두 (17:00에 시작)	27 - 수산양 합사(1차) (오전 8시 ~) * 4일 후 격리(분리) (10월 1일)	28	29

● 루텔라이스 : 1,600원/병(10ml), PG600 : 8,800원/병(5ml), 휘타길 : 19,800원/병(5ml)

\* 소요량 (14두 분당, 원래 13두분 소요) : 가구당 루텔라이스 7병, PG600 14병, 휘타길 14병 (비용 총액 : 512,400원)

**어미 산양(염소) 이야기**

2014년 가을날 호두나무를 치료하는 시간에 늙은 염소가 새끼를 낳았다. 열 살도 넘는 염소가, 제 몸도 가누기가 힘든 어미가 외래종인 염소의 새끼를 낳았다. 아마 술한 새끼들 중에도 어찌면 힘에 부치지만 최고로 기쁜 것처럼 보였다. 새끼는 어미의 나이를 아랑곳 하지 않는다. 오직 젖무덤만 부풀어져 풍성하기만 하면 된다. 머리에 하얀 목화 꽃처럼 문양을 가진 검은 염소 새끼가 어미를 괴롭히고 있다. 틈만 나면 어미의 가랑이 사이로 들어가 무릎 꿇고 부풀어진 젖무덤을 무작정, 무작정 입으로 들이받아 젖을 내게 한다. 무릎 꿇고 젖 먹는 염소가 어미를 공경한다지만 새끼가 어미젖을 주둥이로 치받는 것을 보면 참으로 새끼가 무정해 보인다. 늙은 어미가 나이 들면 더 이상 뱄 수가 없다. 늙었뉘엿 걸음걸이도 새끼만 못하다. 며칠 전엔 아주 늙은 어미 염소가 새끼를 두 마리 낳고 힘이 들어 서 있지 못하더니 저 체중 새끼 염소도 젖을 먹지 못해 이틀 만에 기어이 죽었다. 이 어미는 까만 염소와 잿빛 염소 새끼를 각각 낳았다. 아마 발정 때에 까만 재래산양 수컷과 누비양(흰색과, 갈색, 흑색이 혼재한 수컷) 수컷과도 함께 교미한 것으로 여겨졌다. 그 어미는 새끼를 떠나보내고 며칠 후에야 기력이 생겼지만 이미 자기 새끼는 없어졌고 새끼 셋 딸린 다른 어미 염소의 새끼들이 부풀어 오른 새끼 잃은 어미 염소의 젖을 탐하니 그 늙은 어미 염소도 기꺼이 세마리 새끼들에게도 젖을 내어 주곤 했다. 무심한 세 마리 새끼의 젊은 어미는 자기 새끼를 늙은 어미에게 빼앗기는 것으로 여겨 늙은 어미를 기어이 들이받아 죽게 하였다. 새끼 잃은 늙은 어미는 새끼 잃은 지 보름 만에 죽임을 당했다. 젖은 부풀어 있었지만 일어 설 수가 없었으며, 엎드리지도 못하고 드러누워 이틀을 버티다 죽었다. 어미도 기어이 새끼 따라 하늘나라로 갔다. 새끼들과 어미의 영혼이 가을의 화창한 날에 천국으로 가길 기도해 주었다.

호두나무를 치료하고 새끼 딸린 늙은 어미 염소에게 아내가 준비한 씬덩굴을 건네주고서야 농장에서 집으로 아내와 함께 귀가하였다. 아내는 나보다도 염소를 더 소중히 여긴다.

다음 날 새벽에 일어나 아내에게 늙은 어미 염소들의 이야기를 전해 주었다. 세상의 이야기꺼리도 호두나무를 치료하면서 보아 온 늙은 어미 염소 이야기를 남긴다. 내가 남긴 늙은 어미 염소를 기억해 주기 바란다. 새끼도 잃고, 함부로 남의 새끼에게 젖먹인 늙은 어미 염소가 제 새끼가 더 튼튼해지는 줄도 모르는, 그리고 고마워해야 할 젊은 어미 염소에게 기어이 들이 받쳐 죽었다는 슬픈 이야기를.

구월은 인생 사십대의 계절이다. 젊은이도, 늙은이도 아니지만 곧 늙어지는 인생의 계절이다. 여름이 끝나고 가을의 문턱이 바로 눈앞에 보이는 구월의 마지막 날에 풍성한 호두나무의 미래를 본다.

2014. 9. 29.



## 부록 2

### < 2013년 학술발표 실적 1 >

#### 산양에 있어서 다배란 처리가 난소 반응 및 난자 생산에 미치는 영향

이장희<sup>1)</sup>, 백순화<sup>2)</sup>, 이주형<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>바이오컬처(주), <sup>2)</sup>백석대학교

본 연구는 산양에 있어서 개량 및 번식 효율을 개선하고 핵이식수정란 생산 기술을 개발하기 위하여 다배란 처리가 난소 반응과 난자 및 수정란 생산에 미치는 영향을 조사하고자 하였다.

산양에 있어서 다배란처리가 난포의 발달에 미치는 영향을 조사하기 위해 산양 18두에 대해 각각 6두씩 2회 반복 처리하였으며 **Group I**은 번식계절 도래 시기(9월 말)에 GnRH(휘타길 1.5ml)를 주사하고 1주일 후에 PGF<sub>2</sub>α(Lutelys 1.0ml)와 PG 600(1.5ml)\*\*을 주사하고 48시간 후에 수술하여 난포란를 채란하였으며, **Group II**는 번식계절 중(10~12월)에 대해 PGF<sub>2</sub>α(Lutalyse, 1.0ml)를 주사하고 2일 후 PG 600(1.5ml)와 GnRH(휘타길, 1.5ml)를 병용 주사한 후 48시간 때에 채란하였으며, **Group III**은 비번식계절(4~6월) 중에 Ring-CIDR(그림 4) 장치와 GnRH(휘타길 1.5ml)를 주사하고 11주일 후에 PGF<sub>2</sub>α(Lutelys 1.0ml)을 주사하고 24시간 후에 FSH(Folltropin V, 1.5ml)와 GnRH(휘타길, 1.5ml)를 병용 주사한 후 24시간 때에 채란하여 각 Group에 대해 3두씩은 난포수와 회수된 난포란의 수를 조사하였으며, 3두씩은 PGF<sub>2</sub>α 주사 후 72시간 때에 예정시각 인공수정을 실시하였다. 발정동기화 및 다배란 처리 방법이 난소 반응과 난자 및 수정란 생산에 미치는 영향을 조사하고자 PGF<sub>2</sub>α 및 PG600 주사 후 48시간째에 마취(체중 kg 당 KetamineHCl 2mg 및 Xylazine.HCl 0.25mg을 근육 주사)하여 복부를 절개한 후 자궁과 난소를 도출시킨 다음 난소 표면의 난포에 주사침(19G)을 찔러 음압을 작용시켜서 채란하였으며 채란된 난자는 배양액에 세척한 후 현장에서 현미경으로 난자를 채집하여 난소 반응 및 난자수를 조사하였으며, 그 결과는 다음과 같았다.

본 연구 결과 산양의 난포발달은 번식계절 중(**Group II**)이 번식계절 도래 시(**Group I**)보다 호르몬 처리에 대한 반응이 다소 높게 나타났으며(8.6±3.4 vs 8.3±3.2), 난포발달에 영향을 미치는 호르몬처리로 PG600(**Group II**)과 FSH(**Group III**)처리에서는 PG600 처리가 난포발달 및 회수율이 다소 높게 나타났다(p<0.05). 이는 계절번식기간이 다소 난포발달에 다소 효과적이었으나 우리나라 재래산양의 계절번식성이 희박한 근거라고 할 수 있었다.

Key words) *Goat, Estrus Synchronization, Superovulation, Ovum, Ovary Reaction*

\* 본 연구는 2012년 농림수산식품부의 연구개발지원사업으로 수행되었음(과제관리번호 : 112021-3).

\* 일시 : 2013. 10.25 ~ 10.26. 충북대





< 2014년 학술발표 실적 2 >

**번식 및 비번식계절이 재래산양, 누비양 및 무플런 정액의 성장에 미치는 영향**

이장희<sup>1)</sup>, 백순화<sup>2)</sup>, 이주형<sup>1)</sup>  
<sup>1)</sup>바이오컬처(주), <sup>2)</sup>백석대학교

산양과 면양은 단일성 계절번식성 동물로 우리나라와 같이 북반구에 위치한 나라에서는 일조시간이 짧아지는 시기인 가을에 발정이 와서 임신이 되며 봄에 분만하는 것으로 알려져 있다(남반구는 반대로 나타남). 그러나 국내 흑염소인 재래산양은 2년에 3회 분만하는 개체가 많아 번식계절성이 희박한 것으로 알려져 있다. 따라서 산양의 계절번식성은 도입종 의 경우 상대국의 위도에 따라 번식성이 달리 나타날 수 있다.

그러므로 본 연구에서는 번식 및 비번식계절이 우리나라 재래 산양(흑염소)과 도입종인 누비양 및 무플런(Mouflon)의 정액 성장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 번식(9~11월) 및 비번식계절(3~5월)에 대해서 수컷 재래산양, 누비양 및 무플런 2두에 대해 각각 전기자극정액채취법으로 정액을 채취하여 정액성상을 조사하였다. 정액 성장으로는 정액량, 농도 및 활력을 조사하였으며, 전기자극정액채취법으로 정액 채취 시 1~3차 분획으로 정액을 수집하여 분획별 정액 성상을 조사하였다. 정액채취 시 산양 정액은 정액량이 미미하므로 정액채취병에 미리 1ml씩의 Trish Berger 희석액을 분주해 둔 다음에 분획별로 정액을 채취하여 조사하였다. 번식 및 비번식계절이 정액 성장에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 1과 같았다.

Table 1. Effect of breeding- and non breeding-season on goat .

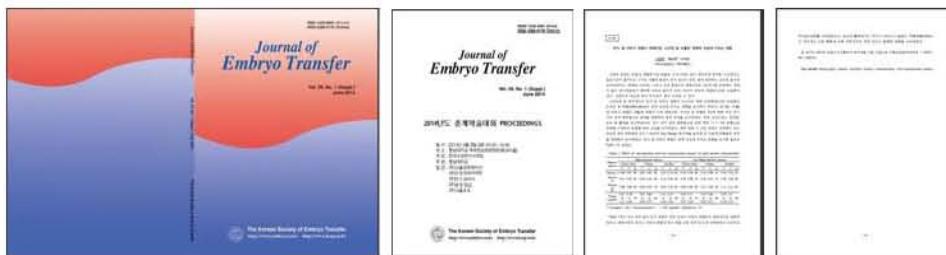
Characteristic	Breeding Season									Non-Breeding Season								
	Korean Native Goat			Nubian			Mouflon			Korean Native Goat			Nubian			Mouflon		
	V	C	M	V	C	M	V	C	M	V	C	M	V	C	M	V	C	M
Section I	0.59	0.97	81.7	0.32	0.30	61.7	0.20	0.13	31.7	0.40	0.45	73.3	0.18	0.36	11.7	0.08	0.24	21.7
Section II	0.51	0.88	83.3	0.25	0.44	73.3	0.14	0.26	53.3	0.32	0.88	81.7	0.15	0.27	73.3	0.05	0.25	55.3
Section III	0.89	0.50	66.7	0.38	0.40	46.7	0.09	0.28	36.7	0.78	0.80	56.7	0.12	0.40	36.7	0.11	0.12	16.7
Total (MSD)	0.7±0.20	0.8±0.25	77.2	0.3±0.06	0.4±0.07	60.6	0.1±0.05	0.2±0.08	40.6	0.5±0.07	0.7±0.23	70.6	0.2±0.03	0.2±0.07	40.6	0.1±0.03	0.1±0.08	31.6

\* Volume(V, ml), Concentration(C : x 10<sup>9</sup> cell/ml), Motility(M, %)

Table 1에서 보는 바와 같이 번식계절의 정액 성상이 비번식계절보다 일반적으로 양호하였으나 재래산양의 경우는 비번식계절과 번식계절간의 정액 성장 중 정액량에서 유의적인 차이(p<0.05)를 나타내었으나 농도와 활력에서는 차이가 나타나지 않았다. 무플런(Mouflon)의 경우에는 다른 품종에 비해 전반적으로 정액 성상이 불량한 경향을 나타내었다.

Key words) **Native-Goat, Nubian, Mouflon, Semen, Characteristic, Non-reproductive season**

\* 본 연구는 2012년 농림수산식품부의 연구개발지원사업으로 수행되었음(과제번호 : 112021-04-1-SB010).  
 \* 한국수정란이식학회 2014년 춘계학술대회지 P. 34. (2014. 6. 5. 충남대 청심화홀.)



<국제학술발표 실적 3>

Effect of Breeding and Non-breeding Season on semen characteristics in Korean native Goat, Nubian and Mouflon

Jang-Hee Lee<sup>1)</sup>, Soon-Hwa Baek<sup>2)</sup>, Jo-HyungLee<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Bioculture Co., Ltd., Myanghyangro 1112-46, Cheonan, Chungnam, 331-822 Republic of Korea

<sup>2)</sup>BaekseokUniversity, Cheonan, Chungnam, Republic of Korea

bio-culture@hanmail.net

Goat and Ovine are known as 'short breeding season animals' whose estrus come in autumn (The breeding season in Korea, which is located in the Northern Hemisphere has shorter day time) and after pregnancy, they bear in spring. (It is shown reversely in the Southern hemisphere countries.) However, Korean native goat has scarce breeding seasonality because she gets pregnant 3 times every 2 years. Accordingly, breeding seasonality of a goat could be shown differently depending on relevant country's latitude. Therefore, this study was conducted to compare characteristics of semen collected by electronic ejaculator during breeding season (September ~ November) and non-breeding season (March ~ May) in order to research influence of breeding season and non-breeding season on property of semen of Korean native goat and species which are imported.

Volume, concentration and motility as characteristics of semen collected and classified as section I, II and III were investigated. Since the amount of collected semen from goat is little, 1ml of Trish Berger's dilution was added to each bottle before semen was collected from the goat. The results of breeding season and non-breeding season's effect on the characteristic of semen were as below (Table 1).

Table 1. Effect of breeding- and non breeding season on goat .

Characteristic	Breeding Season									Non-Breeding Season								
	Korean Native Goat			Nubian			Mouflon			Korean Native Goat			Nubian			Mouflon		
	V	C	M	V	C	M	V	C	M	V	C	M	V	C	M	V	C	M
Section I	0.59	0.97	61.7	0.32	0.30	61.7	0.20	0.13	31.7	0.40	0.45	73.3	0.18	0.36	11.7	0.08	0.24	21.7
Section II	0.51	0.88	63.3	0.25	0.44	73.3	0.14	0.25	53.3	0.32	0.88	61.7	0.15	0.27	73.3	0.05	0.25	53.3
Section III	0.80	0.50	56.7	0.38	0.40	46.7	0.00	0.28	36.7	0.78	0.80	56.7	0.12	0.40	36.7	0.11	0.12	16.7
Total (M±SD)	0.7±0.20	0.8±0.25	77.2	0.3±0.06	0.4±0.07	60.6	0.1±0.05	0.2±0.08	40.5	0.5±0.07	0.7±0.23	70.5	0.2±0.03	0.2±0.07	40.5	0.1±0.03	0.1±0.03	31.5

\* Volume(V, ml), Concentration(C :  $\times 10^9$  cell/ml), Motility(M %)

As a result, the characteristic of semen taken in breeding season was generally better for Korean native goat, Nubian and Mouflon than the one taken in non-breeding season for Korean native goat, Nubian and Mouflon. In case of Korean native goat, there was no significant difference ( $p < 0.05$ ) in between characteristics of semen collected from breeding season and non-breeding season. In case of Nubian and Mouflon, volume as a characteristic of semen collected in breeding season was more than collected in non-breeding season ( $p < 0.05$ ). There was no significant difference in concentration and motility of semen in between the one taken in breeding season and the other taken in non-breeding season. Especially, in case of Mouflon, as a characteristic of semen was poor comparing with other species.

Key words) Korean Native Goat, Nubian, Mouflon, Semen, Characteristic, NonBreeding-season

\*\* This study was carried out under the project to support the research and development by the Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries in 2012 (Task No.: 112021-04-1-SB010).

The Annual Scientific Meeting of the Endocrine Society of Australia and the Society for Reproductive Biology 2014 will be held from 24th - 27th August at the Melbourne Convention & Exhibition Centre.(Australia)



(근거)

<국제 학술대회 제출 초록(등록 예정)> - 2014. 8. 24(호주)

Abstract Submission — View Submitted Abstracts

Hello, Lee Jang-hee. [Logout](#)

currinda

Rego

This is a preview of your abstract's appearance in the handbook.  
 Please ensure that the information below is correct and is displayed correctly.

**Effect of Breeding and Non-breeding Season on semen characteristics in Korean native Goat, Nubian and Mouflon** (18159)

Lee Jang-hee <sup>1</sup> Baek Soon-hwa <sup>2</sup> Lee Ju-hyung <sup>1</sup>

1. BIO CULTURE Inc., Ltd, Cheonan City, Chungnam, South Korea
2. Computer Science, Baekseok Univ., Cheonan, Chungnam, South Korea

Goat and Ovine are known as 'short breeding season animals' whose estrus come in autumn (The breeding season in Korea, which is located in the Northern Hemisphere has shorter day time) and after pregnancy, they bear in spring. However, Korean native goat has scarce breeding seasonality because she gets pregnant 3 times every 2 years. Accordingly, breeding seasonality of a goat could be shown differently depending on relevant country's latitude. Therefore, this study was conducted to compare characteristics of semen collected by electronic ejaculator during breeding season (September ~ November) and non-breeding season (March ~ May) in order to research influence of breeding season and non-breeding season on property of semen of Korean native goat and species which are imported.

Volume, concentration and motility as characteristics of semen collected and classified as section I, II and III were investigated. The results of breeding season and non-breeding season's effect on the characteristic of semen were as below (Table 1).

**Table 1. Effect of breeding- and non breeding season on goat.**

Quadratic	Breeding Season									Non-Breeding Season								
	Korean Native Goat			Nubian			Mouflon			Korean Native Goat			Nubian			Mouflon		
	V	C	M	V	C	M	V	C	M	V	C	M	V	C	M	V	C	M
Section I	0.59	0.97	0.7	0.32	0.36	0.17	0.20	0.13	0.7	0.40	0.45	0.53	0.18	0.36	0.17	0.50	0.24	0.7
Section II	0.51	0.90	0.3	0.25	0.44	0.14	0.26	0.33	0.32	0.80	0.7	0.15	0.27	0.33	0.25	0.25	0.25	0.7
Section III	0.89	0.50	0.7	0.36	0.40	0.57	0.09	0.28	0.7	0.76	0.80	0.57	0.12	0.40	0.7	0.11	0.12	0.7
<b>Total (MSE)</b>	<b>0.7±0.10</b>	<b>0.8±0.25</b>	<b>0.72</b>	<b>0.3±0.06</b>	<b>0.4±0.07</b>	<b>0.15</b>	<b>0.1±0.05</b>	<b>0.2±0.06</b>	<b>0.15</b>	<b>0.5±0.07</b>	<b>0.7±0.23</b>	<b>0.5</b>	<b>0.2±0.03</b>	<b>0.2±0.07</b>	<b>0.15</b>	<b>0.1±0.03</b>	<b>0.1±0.06</b>	<b>0.15</b>

\* Volume(V, ml), Concentration(C : x 10<sup>6</sup> cell/ml), Motility(M %)

As a result, the characteristic of semen taken in breeding season was generally better for Korean native goat, Nubian and Mouflon than the one taken in non-breeding season for Korean native goat, Nubian and Mouflon. In case of Korean native goat, there was no significant difference (p<0.05) in between characteristics of semen collected from breeding season and non-breeding season. In case of Nubian and Mouflon, volume as a characteristic of semen collected in breeding season was more than collected in non-breeding season (p<0.05). Especially, in case of Mouflon, as a characteristic of semen was poor comparing with other species.

Key words) Korean Native Goat, Nubian, Mouflon, Semen, Characteristic, Non Breeding-season

\*\* This study was carried out under the project to support the research and development by the Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries in 2012 (Task No.: 112021-04-1-SB010).

Close View

<학술발표 실적 4>

동해보호제가 산양 및 무플런 정자의 동결용해 후 생존성(활력)에 미치는 영향

이장희<sup>1)</sup>, 백순화<sup>2)</sup>, 이주형<sup>1)</sup>  
<sup>1)</sup>바이오컬처(주), <sup>2)</sup>백석대학교

본 연구는 우리나라 산양(흑염소)과 동물원에서 사육중인 무플런(Mouflon)에 있어서 인공수정을 위한 동결정액 생산기술을 확립하기 위해 동해보호제가 동결 용해 후 내동성에 미치는 영향을 조사하여 생존성이 우수한 동해보호제를 찾아내고자 하였다. 이를 위해 수컷 산양 및 무플런 2두에 대해 각각 전기자극정액채취법으로 정액을 채취하여 채취 직 후부터 동결 용해 후까지 활력(생존성)을 단계별로 조사하였으며, 이 때 동해보호제로는 1차 보존액에 각각 egg yolk(20%, v/v), skim milk(10%, v/v), soybean milk(10%, v/v) 및 dried persimmon(건조 꽃감 1.0%, w/v)을 첨가하여 1차 보존액으로 제조하였으며 2차 보존액은 1차 보존액에 glycerol 12.8%(v/v)를 첨가하여 2시간 이상 교반하여 평형 시킨 후 2차 보존액으로 사용하였다. 정액의 동결방법은 Trish Berger(1989, Theriogenol, 32:69-77)의 방법에 준하였으며, 0.25ml에 증진하여 동결하였으며, 최종 정자 농도는  $1.2 \times 10^8$  cell/ml가 되도록 하였다. 산양과 무플런 정자의 동결보존 시 동해보호제로 egg yolk, skim milk, soybean milk 및 dried persimmon을 사용하였을 경우 동결 용해 후 활력을 조사한 결과는 Table 1과 같았다.

Table 1. Effect of cryoprotectant on goat sperm cryopreservation.

Cryoprotectant	Goat, Motility(%) of Sperm				Mouflon, Motility(%) of Sperm			
	Egg Yolk	Skim Milk	Soybean Milk	Persimmon	Egg Yolk	Skim Milk	Soybean Milk	Persimmon
After collection	92.5	90.0	92.5	90.0	85.0	85.0	85.0	85.0
Before preservation	85.0	80.5	85.0	60.0	72.0	60.0	75.0	70.0
After preservation	75.5	72.5	75.0	55.5	60.0	50.5	65.0	45.0

Table 1에서 보는 바와 같이 동해보호제의 종류에 따른 내동성(활력)은 동물성인 egg yolk가 75.5%로 가장 높았으며, 식물성의 soybean milk도 75.0%의 높은 활력을 나타내었다. Dried persimmon(꽃감)을 사용하였을 경우에는 가장 낮은 45.0%의 활력을 나타내었다. 무플런(Mouflon) 정자의 동결 성적은 전반적으로 산양보다 매우 낮은 경향을 나타내었다.

Key words) *Goat, Mouflon, Cryoprotectant, Sperm, Motility, Preservation*

\* 본 연구는 2012년 농림수산식품부의 연구개발지원사업으로 수행되었음(과제번호 : 112021-04-1-SB010).

출처 : 한국동물번식학회 2013년도 춘계학술대회지. p. 52. (P 027)



<2013년 학술발표 실적>

### Studies the Production of cloned Embryo by antler velvet cell of Deer

Jang-Hee Lee<sup>1)</sup>, Soon-Hwa Baek<sup>2)</sup>, Joo-Hyung Lee<sup>1)</sup>, Yong-Nan Xu, Nam-Hyung Kim<sup>3)</sup>.

<sup>1)</sup>BIOCULTURE Inc., <sup>2)</sup>Baekseok university, <sup>3)</sup>Chungbuk national university

In Korea, deer breeding began in 1955 when spotted deers were imported from Thailand. Originally, deer were imported only for the purpose of decoration, but economic development led to an increase in the consumption of deer velvet antlers. As a result, deer farming was promoted as a new source of income for livestock farmers. However, while Korea has the highest consumption of deer velvet antlers, approximately 20 percent of that demand is supplied by domestic farmers. Therefore, it is necessary to modify breeding techniques to increase the domestic output of high quality velvet antlers. In particular, there is an urgent need to develop the techniques of artificial insemination(AI) and embryo transfer(ET) and to make efficient use of high quality species. But it is still difficult to apply the techniques developed in other countries because the deer is a seasonal breeding animal. Thus, in Korea it is necessary to develop a technique that is appropriate to the climate of this country.

This study is undertaken in order to develop an estrus and ovulation synchronization technique that is suitable to the Korean climate, to collect and cryo-preserve velvet cell(mesenchyme) from a high quality species, to developed technique for culture of oocytes and velevt cells *in vitro*. and then to use in the production and transfer of cloned embryo of deer controlled reproductively, following studies were conducted.

- 1) Development of efficient culture system *In vitro*, technologies for collection of velvet antler cell
- 2) Development of technologies for superovulation to produce many of oocyte
- 3) Development of technologies for collection and in vitro culture of oocytes
- 4) Development of technologies for production and implantation of cloned embryo

This work were obtained these conclusions. Fawn were producted successfully 1 Elk childbirth and 1 flower deer(died by dystocia) after transplanting of only in vivo embryo. Technology of synchronization of estrus, sperovulation, collection of oocytes and embryos, artificial insemination, in vitro culture(development), embryo transfer, production of cloned embryo were established. Cloned embryos were produced with using antler cell but failed in producing fawn after transplant.

**Key word : Deer, Superovulation, Embryo transfer, Cloned embryo, Vevet Antler cell**

\*\* This study was carried out under the project to support the research and development by the Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries in 2011~2014 (Task No.: 112021-04-1-SB010 and 109008-03-1).

\* 일시 : 2014. 7. 4~5. 한국동물번식학회 춘계학술대회지. 제주대학교 국제학술회의장



## 산양에 있어서 비번식계절의 발정동기화 방법이 수태율에 미치는 영향

이장희<sup>1)</sup>, 백순희<sup>2)</sup>, 김상환<sup>3)</sup>, 류준열<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>바이오컬처(주), <sup>2)</sup>백석대학교, <sup>3)</sup>서울호서직업전문학교

<sup>1)</sup>*Bioculture Co., Ltd., Myanghyangro 1112-46, Cheonan, Chungnam, 331-822 Republic of Korea*

<sup>2)</sup>*Baekseok University, <sup>3)</sup>Seoul Hoseo Technical College*

*bio-culture@hanmail.net*

산양의 개량과 증식으로 농가 소득 확대 및 지역 특화산업화를 통해 산양 산업의 세계적인 기술 우위 확보를 위해 바이오컬처(주) 유전자원연구소에서 사육중인 경산 산양 36두에 대해서 비번식계절(3~5월)에 발정 및 배란 동기화 처리하여 인공수정 후 수태율을 조사하였다. 발정관찰은 정관 수술된 시정모를 이용하여 1일 2회(08:00~09:00, 17:00~18:00) 발정을 관찰하였다. **처리구 I**은 CIDR를 13일 동안 질 내에 장치하고 제거 시 hCG 40IU+PMSG 80IU(PG 600, Intevet, Holland)를 근육주사하고 PGF<sub>2α</sub> 5mg (Lutalyse, Upjohn, U.S.A)를 추가 처리(근육주사)하였고, **처리구 II**는 CIDR제거 직후 hCG 40IU+PMSG 80IU 및 FSH 40mg를 주사하였으며, **처리구 III**은 hCG 60IU+PMSG 120IU를 주사하고 GnRH 0.3ml(휘타길) 추가 주사하여 발정 및 다배란 처리 한 후 60시간 후에 각각 인공 수정하였다. 이 때 인공수정용 정액은 전기자극법으로 채취된 정액으로 채취 직후 희석하여 정자의 농도가  $1.0 \times 10^8$  cell/ml가 되도록 조정하였으며, 이 정액을 0.25ml straw에 충전하여 질경으로 자궁경관을 확인한 후 경관 내에 주입하였다. 수태율은 인공수정 후 15일부터 45일까지 발정관찰에 의해 발정이 재귀되지 않은 경우(non-return)를 수태로 간주하였다. 발정동기화 방법에 따른 수태율은 **처리구 I**이 75.0%(9/12), **처리구 II**가 66.7%(8/12) 및 **처리구 III**이 33.3%(4/12)였다.

이상의 결과에서 산양에 있어서 비번식계절에 수태율을 높이기 위한 발정 동기화 방법으로는 **처리구 I**의 방법이 유리한 것으로 조사되었다. **처리구 III**의 방법에 있어서 GnRH 처리가 수태율에 유리할 것으로 판단되었으나 가장 낮은 수태율을 나타내었다. **처리구 I**과 **II**에서는 발정 재귀 40일경에 각각 1, 2두가 발정을 나타낸 숫자가 포함되었다. 인공수정 후 40일경에 발정 재귀를 나타낸 산양의 경우에는 착상 지연이나 조기 배아폐사가 원인으로 사료되었다.

Key words) **산양, 비번식계절, 발정동기화, 인공수정, 수태율**

***Native-Goat, Nonbreeding season, Estrus Synchronization, Artificial Insemination, Conception rate***

\* 본 연구는 2012년 농림축산식품부의 연구개발지원사업으로 수행되었음(관리번호 : 112021-04-1).

\* 일시 : 2015년 7월 2일 ~ 3일(장소 : 강원대학교 60주년기념관)



<학술발표 실적 7>

산양에 있어서 다배란처리 방법이 회수된 난자의 체외성숙 및  
핵이식 후 융합과 발생에 미치는 영향

이장희<sup>1, 3)</sup>, 백순화<sup>2)</sup>, 이주형<sup>1)</sup>, 정푸른<sup>3)</sup>, 주찬양<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>바이오킨처(주), <sup>2)</sup>백석대학교, <sup>3)</sup>서울호서직업전문학교

<sup>1)</sup>Bioculture Co., Ltd., Myanghyangro 1112-46, Cheonan, Chungnam, 331-822 Republic of Korea

<sup>2)</sup>Baekseok University, <sup>3)</sup>Seoul Hoseo Technical College

bio-culture@hanmail.net

본 연구는 우리나라 재래산양의 핵이식수정란 생산 기술을 개발하기 위하여 다배란 처리 방법이 회수된 난포란의 체외성숙 후 핵이식 융합율과 복제란의 발달에 미치는 영향을 조사하고자 하였다. 산양의 핵이식란을 생산하기 위해 번식계절 중(10~12월)에 재래산양 18두에 대해서 Group별로 6마리씩 배치하여 다배란 처리를 2회 반복하여 실시하였다. 다배란 처리방법으로 Group I은 GnRH를 주사하고 1주일 후에 PGF<sub>2</sub>α + PG 600 주사 후 48시간 때에 채란하였으며, Group II는 PGF<sub>2</sub>α를 주사하고 2일 후에 PG 600 + GnRH 주사한 후 48시간 때에 채란하였으며, Group III은 Ring-CIDR 장치를 질 내에 장치하고 GnRH를 주사한 후 11일 후 Ring-CIDR를 제거하고 PGF<sub>2</sub>α 주사한 다음 24시간 후에 FSH + GnRH주사 후 24시간 때에 채란하였다. 회수된 난포란은 배양액(H199-10)에 세척한 후 실험실로 옮겨와 37 °C incubator(at in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> 95% air)에서 36시간 성숙시킨 후 성숙율을 조사하고 데미콜신을 30분 동안 처리하여 난구세포를 제거한 후 제핵하고 귀에서 추출한 체세포의 핵을 제핵된 난자에 융합시켜 융합율과 발생능을 조사한 결과는 다음과 같았다.

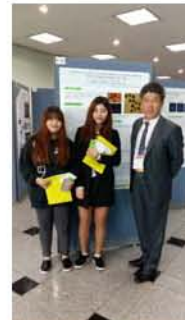
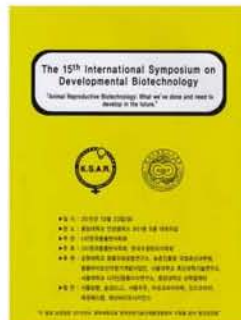
각 처리별 채란 수는 각각 32, 33 및 38개 였으며, 체외성숙 후 metaphase II(제2성숙분열 단계) 단계까지 성숙된 체외성숙율은 평균 68.9%였다. 데미콜신을 처리하여 난구세포를 제거한 후 융합시켰을 때의 융합율은 39.6% 였으며, 융합된 난자 중 세포분화로 2-cell 이상으로 발생된 복제수정란은 각각 2, 3 및 4개로 42.9%가 발생에 성공하였다.

본 연구 결과 재래산양의 핵이식수정란을 생산하기 위한 다배란 처리 방법으로는 Group I, II의 방법이 다소 유리한 것으로 나타났다.

Key words) *Goat, Superovulation, In vitro Maturation, fusion, Cloned embryo*

\* 본 연구는 2012년 농림수산물부의 연구개발지원사업으로 수행되었음(과제번호 : 112021-04-1-SB010).

\* 일시 : 2015. 10. 23. 중앙대. 제15회 발생공학회 국제심포지움. P-72(p.71)



### 부록 3

#### <특허 성과>



특 허 제 10-1263916 호    출원번호    제 2011-0002874 호  
(PATENT NUMBER)    (APPLICATION NUMBER)    (2011-0002874 호)  
출원일    2011년 01월 11일  
(FILING DATE(Y/M/D))    (2011.01.11)  
등록일    2013년 05월 07일  
(REGISTRATION DATE(Y/M/D))    (2013.05.07)

발명의명칭 (TITLE OF THE INVENTION)  
심 호르몬 방출 장치 및 이를 이용한 동물 피임 및 발정 유도 방법

특허권자 (PATENTEE)  
등록사항안에 기계

발명자 (INVENTOR)  
등록사항안에 기계

위의 발명은 「특허법」에 따라 특허등록원부에 등록  
되었음을 증명합니다.  
(THIS IS TO CERTIFY THAT THE PATENT IS REGISTERED ON THE REGISTER OF THE KOREAN  
INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE.)

2013년 05월 07일



특 허 제 10-1263915 호    출원번호    제 2011-0002873 호  
(PATENT NUMBER)    (APPLICATION NUMBER)    (2011-0002873 호)  
출원일    2011년 01월 11일  
(FILING DATE(Y/M/D))    (2011.01.11)  
등록일    2013년 05월 07일  
(REGISTRATION DATE(Y/M/D))    (2013.05.07)

발명의명칭 (TITLE OF THE INVENTION)  
역류 방지 부재를 포함하는 정맥 주입 장치

특허권자 (PATENTEE)  
등록사항안에 기계

발명자 (INVENTOR)  
등록사항안에 기계

위의 발명은 「특허법」에 따라 특허등록원부에 등록  
되었음을 증명합니다.  
(THIS IS TO CERTIFY THAT THE PATENT IS REGISTERED ON THE REGISTER OF THE KOREAN  
INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE.)

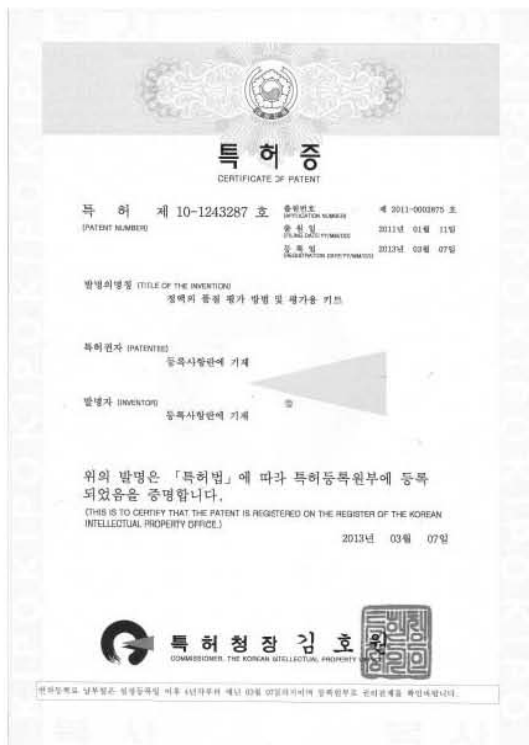
2013년 05월 07일



전자등록료 납부일은 법정등록일 이후 4년차부터 매년 05월 07일까지이며 등록원부에 권리관계를 확인하십시오.



전자등록료 납부일은 법정등록일 이후 4년차부터 매년 05월 07일까지이며 등록원부에 권리관계를 확인하십시오.



특 허 제 10-1243287 호    출원번호    제 2011-0001875 호  
(PATENT NUMBER)    (APPLICATION NUMBER)    (2011-0001875 호)  
출원일    2011년 01월 11일  
(FILING DATE(Y/M/D))    (2011.01.11)  
등록일    2013년 03월 07일  
(REGISTRATION DATE(Y/M/D))    (2013.03.07)

발명의명칭 (TITLE OF THE INVENTION)  
정맥의 골강 펌프 방법 및 펌프용 키트

특허권자 (PATENTEE)  
등록사항안에 기계

발명자 (INVENTOR)  
등록사항안에 기계

위의 발명은 「특허법」에 따라 특허등록원부에 등록  
되었음을 증명합니다.  
(THIS IS TO CERTIFY THAT THE PATENT IS REGISTERED ON THE REGISTER OF THE KOREAN  
INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE.)

2013년 03월 07일



전자등록료 납부일은 법정등록일 이후 4년차부터 매년 03월 07일까지이며 등록원부에 권리관계를 확인하십시오.



특 허 제 10-1459674 호    출원번호    제 2013-0004130 호  
(PATENT NUMBER)    (APPLICATION NUMBER)    (2013-0004130 호)  
출원일    2013년 03월 29일  
(FILING DATE(Y/M/D))    (2013.03.29)  
등록일    2014년 10월 31일  
(REGISTRATION DATE(Y/M/D))    (2014.10.31)

발명의명칭 (TITLE OF THE INVENTION)  
녹음 세보의 제작 방법

특허권자 (PATENTEE)  
중앙대학교 산학협력단(115071-0\*\*\*\*)  
서울 동국구 옥석동 221

발명자 (INVENTOR)  
등록사항안에 기계

위의 발명은 「특허법」에 따라 특허등록원부에 등록  
되었음을 증명합니다.  
(THIS IS TO CERTIFY THAT THE PATENT IS REGISTERED ON THE REGISTER OF THE KOREAN  
INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE.)

2014년 10월 31일



전자등록료는 2012년부처 매년 10월 31일까지 납부하여야 하며, 등록원부에 권리관계를 확인하십시오.



< 별첨 >

[별첨 1]

### 연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 산양에 있어서 생식세포의 포괄적 이용에 의한 규모화 인공수정, 수정란이식 및 핵이식 수정란 생산기술 확립				
	(영문) Techniques establishment of a large scale AI, ET and production of nuclear transferred embryos by comprehensive using of germ cells in goat				
주관연구기관	농업회사법인 바이오켈처(주)		주 관 연 구 자	(소속) 농업회사법인 바이오켈처(주)	
참 여 기 업			채	(성명) 이 장 희	
총연구개발비 (360,000천원)	계	120,000	총 연 구 기 간	2012. 8. 10~2015. 8. 9 (3년)	
	정부출연 연구개발비	90,000	총 연 구 원 수	총 인 원	27
	기업부담금	30,000		내부인원	7
	연구기관부담금			외부인원	2

○ 연구개발 목표 및 내용

본 과제는 “산양에 있어서 생식세포의 포괄적 이용에 의한 규모화 인공수정, 수정란이식 및 핵이식 수정란 생산 기술 확립”에 관한 연구로 우리나라의 계절에 알맞은 산양의 발정동기화 및 다배란 유기 기술을 개발하고, 인공수정과 수정란이식기술을 확립하며, 우수 산양의 체세포로부터 공여 핵을 확보하여 복제 수정란 생산과 이식기술을 개발하고자 아래와 같은 연구를 수행하였다.

- 1) 산양 정액의 동결보존과 발정동기화 및 예정시각 인공수정기술 개발
- 2) 산양의 난포란 채란과 체외배양
- 3) 다배란 유기와 수정란이식기술 개발
- 4) 체세포로부터 공여 세포 핵 확보 및 동결보존
- 5) 핵이식 수정란의 체외배양과 복제 수정란 생산
- 6) 복제 수정란의 이식기술 개발

○ 연구 결과

- 1) 동해보호제의 종류에 따른 내동성(활력)은 동물성인 egg yolk가 75.5%로 가장 높았다.
- 2) 산양에 있어서 발정확인율을 개선하기 위하여 시정모를 이용한 결과 육안적 관찰(대조구)에 비하여 발정확인율이 33.1% 증가하여 90.6%의 발정확인율을 나타내었다.
- 3) Ring-CIDR에 의한 비번식계절에서의 발정동기화에 의한 Non-return rate(%)은 50.0%로 번식계절의 수태율(66.7%)보다 낮았다.
- 4) 번식계절 기간이 비번식계절 보다 다소 난포발달에 효과적이었으나 난소반응이 비슷한 수준으로 보아 우리나라 재래산양의 계절번식성은 희박하다고 할 수 있다. 정액 성장도 같은 경향을 나타내었다.
- 5) 예정시각 인공수정(3 ~6두 그룹) 후 채란되지 않은 처리별 각 3두에서 Group I과 Group II에서 각각 3두 및 1두에서 분만이 이루어졌다. 전체 9두 중 4두가 분만되어 44.4%의 분만율을 나타내었다. 분만된 어미들은 분만 예정일(수정 후 150일) ± 2일 이내에 분만이 이루어졌으며(Fig. 16), 평균 임신기간은 151.6일(n=13)이었다.
- 6) 체내 수정란과 체외 수정란을 비외과적으로 이식한 결과 체내수정란 이식에서는 3두 중 1두가 쌍자를 분만하였으며, 체외수정란 이식에서는 4두 중 1두가 1마리를 분만하였다. 본 연구에서 무푸른 정액으로 인공수정(또는 교배) 및 수정된 수정란으로 태어난 자양은 포유 중에 폐사하는 경향이 많았다.
- 7) Group 별 32, 33 및 38개의 난포란을 성숙시킨 후 제핵하고 체세포 핵을 이식하였을 때 융합율은 평균 39.6%였다(36.4 ~ 50.0%). 4-cell 이상으로 발생된 복제수정란은 모든 처리에서 총 8개를 생산하였으며 외과적, 비외과적으로 각각 복제수정란을 2개씩 이식하였으나 산자 생산에는 이르지 못하였다.

○ 연구성과 활용실적 및 계획

- 실적 : 특허출원 4, 특허등록 1건, 논문게재 2, 학술발표 10편을 달성하였다.
- 계획 : 자체 사업화(1건), 교육.지도 계획(1건), 특허출원등록 계획(1건)



[별첨 2]

## 자체평가 의견서

연구개발분야	생명산업기술개발사업	과제구분	<input type="checkbox"/> 지정공모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제	관리번호	112021-04-01-SB010
연구과제명	산양에 있어서 생식세포의 포괄적 이용에 의한 규모화 인공수정, 수정란이식 및 핵이식 수정란 생산기술 확립				
주관연구기관	농업회사법인 바이오컬쳐(주)				
연구담당자	주관연구책임자	이장희			
	협동/위탁/세부 연구책임자	기관(부서)	바이오컬쳐(주)	성명	이장희
		기관(부서)		성명	
		기관(부서)		성명	
연구기간	총 기간	2012.08.10. ~ 2015.08.09.(3년)		당해년도기간	2014.08.10 ~ 2015.08.09
연구비(천원)	총 규모	360,000		당해년도규모	120,000

1. 연구는 당초계획대로 진행되었는가?

당초 계획 이상으로 진행     
  계획대로 진행     
  계획대로 진행되지 못함

○ 계획대로 수행되지 않은 원인은?

2. 당초 예상했던 성과는 얻었는가?

예상외 성과 얻음     
  어느 정도 얻음     
  얻지 못함

성과목표	사업화지표								연구기반지표								
	지식 재산권		기술이전	사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용-홍보		기타 (타구용 등)
	출원	등록		제품화	기술창업	매출창출	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책 활용	홍보 전시	
										SCI	비SCI						
최종목표	3	1	1							1	3						
연구기간 내 달성실적	1	6	2					1		1	10						
달성율(%)	33	600	200							100	333						

3. 연구개발 성과 세부 내용

3-1 기술적 성과

3-2 과학적 성과

3-3 경제적 성과

3-4 사회적 성과

3-5 인프라 성과

4. 연구과정 및 성과가 농식품 기술의 발전·진보에 공헌했다고 보는가?

공헌했음                       현재로서 불투명함                       그렇지 않음

5. 경제적인 측면에서 농식품 산업체의 소득증대에 공헌했다고 보는가?

공헌했음                       현재로서 불투명함                       그렇지 않음

6. 연구개발 착수 이후 국내 다른 기관에서 유사한 기술이 개발되거나 또는 기술 도입함으로써 연구의 필요성을 감소시킨 경우가 있습니까?

없다                       약간 감소되었다                       크게 감소되었다

○ 감소되었을 경우 구체적인 원인을 기술하여 주십시오?

7. 관련된 기술의 발전 속도나 추세를 감안할 때 추가연구가 필요하다고 생각하십니까?

없다                       약간 필요                       매우 조정필요

8. 연구과정에서의 애로 및 건의사항은?

없음

(※ 아래사항은 기업참여시 기업 대표가 기록하십시오)

1. 연구개발 목표의 달성도는?

- 만족                       보통                       미흡

(근거 : 정량적 성과를 달성 함... )

2. 참여기업 입장에서 본 본과제의 기술성, 시장성, 경제성에 대한 의견

가. 연구성고가 참여기업의 기술력 향상에 도움이 되었는가?

- 충분                       보통                       불충분

나. 연구성고가 기업의 시장성 및 경제성에 도움이 되었는가?

- 충분                       보통                       불충분

3. 연구개발 계속참여여부 및 향후 추진계획은?

가. 연구수행과정은 기업의 요청을 충분히 반영하였는가?

- 충분                       보통                       불충분

나. 향후 계속 참여 의사는?

- 충분                       고려 중                       중단

다. 계속 참여 혹은 고려중인 경우 연구개발비의 투자규모(전년도 대비)는?

- 확대                       동일                       축소

4. 연구개발결과의 상품화(기업화) 여부는?

- 즉시 기업화 가능     수년 내 기업화 가능     기업화 불가능

5. 기업화가 불가능한 경우 그 이유는?

구 분	소 속 기 관	직 위	성 명
주관연구책임자	농업회사법인 바이오컬쳐(주)	대표이사	이 장 희 (인)
참여기업 대표			(인)





### 3. 연구목표 대비 성과

성과목표	사업화지표							연구기반지표								
	지식 재산권		기술이전	사업화				기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용		기타 (타 연구용 등)
	출원	등록		제품화	기술창업	매출창업	고용창업		투자유치	논문				학술발표	정책활용	
			SCI					비SCI								
최종목표	3	1	1							1	3					
연구기간 내 달성실적	1	6	2					1	1	1	10					
달성율(%)	33	600	200							100	333					

### 4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	산양 정액의 동결보존과 발정동기화 및 예정시각 인공수정기술 개발
②	산양의 난포란 채란과 체외배양
③	다배란 유기와 수정란이식기술 개발
④	체세포로부터 공여 세포 핵 확보 및 동결보존
⑤	핵이식 수정란의 체외배양과 복제 수정란 생산
⑥	복제 수정란의 이식기술 개발

### 5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장으로 해결	정책 자료	기타
①의 기술		○						○		
②의 기술				○						
③의 기술					○					
④의 기술					○					
⑤의 기술					○					
⑥의 기술					○					

\* 각 해당란에 v 표시

### 6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	산양 정액의 동결보존과 발정동기화 및 예정시각 인공수정기술의 현장으로 해결
②의 기술	산양의 난포란 채란과 체외배양기술의 현장으로 해결
③의 기술	다배란 유기와 수정란이식기술 개발의 현장으로 해결
④의 기술	체세포로부터 공여 세포 핵 확보 및 동결보존기술의 현장으로 해결
⑤의 기술	핵이식 수정란의 체외배양과 복제 수정란 생산 기술의 의 현장으로 해결
⑥의 기술	복제 수정란의 이식기술의 현장으로 해결

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표								연구기반지표								
	지식 재산권		기술이전	사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구용 등)
	출원	등록		제품화	기술창업	매출창출	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책 활용	홍보 전시	
			SCI						비 SCI								
최종목표	3	1	1							1	3						
연구기간 내 달성 실적	1	6	2						1	1	10						
연구종료 후 성과창출 계획	1										2						

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 <sup>1)</sup>	산양 정액의 동결보존과 발정동기화 및 예정시각 인공수정과 수정란 이식		
이전형태	<input checked="" type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식 <sup>2)</sup>	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타( )		
이전소요기간		실용화예상시기 <sup>3)</sup>	
기술이전 시 선행조건 <sup>4)</sup>	사전 기술지도		

- 1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성
- 2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리  
통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리
- 3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
- 4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)

