

818014-2

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개()발간등록번호(O)
농식품연구성과후속지원사업 제2차 연도 최종 보고서

발 간 등 록 번 호

11-1543000-003199-01

과제명 한우 수정란 배양액 및 이식배지 개발을 통한 수태율 향상 연구

최종보고서

2020. 07. 17.

주관연구기관 / (주)엠케이바이오텍
협동연구기관 / 충남대학교 산학협력단

과제명
한우
수정란
배양액
및
이식배지
개발을
통한
수태율
향상
연구
최종보고서

2020

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

농 립 축 산 식 품 부
농림식품기술기획평가원

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “농식품연구성과후속지원사업 _ 한우 수정란 배양액 및 이식배지 개발을 통한 수태율 향상 연구”(개발기간 : 2018. 04. 30 ~ 2019. 12. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2020. 01. 23.

주관연구기관명 : (주)엠케이바이오텍

(대표자) 김 민 규



협동연구기관명 : 충남대학교 산학협력단

(대표자) 이 영 석



주관연구책임자 : 박 연 배

협동연구책임자 : 김 민 규

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	818014-2	해 당 단 계 연 구 기 간	2018.04.31 ~ 2019.12.31	단 계 구 분	2/2
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	농식품연구성과후속지원사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	한우 수정란 배양액 및 이식배지 개발을 통한 수태율 향상 연구			
연구책임자	박 연 배	해당단계 참여연구원 수	총: 14명 내부: 14명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부: 100,000천원 민간: 34,000천원 계: 134,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 14명 내부: 14명 외부: 명	총 연구개발비	정부: 175,000천원 민간: 59,000천원 계: 234,000천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)엠케이바이오텍			참여기업명	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명: 충남대학교 산학협력단			연구책임자: 김 민 규	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반 [국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정] 제24조의 4에 해당하지 않음
-------------------------	--

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	소프트웨어	화합물	생명자원		신품종	
					생명정보	생물자원	정보	실물
특허출원		10-2019-0038371						
특허출원		10-2019-0038368						
기술이전		10-1390536						
상표등록		40-2019-0009804						
상표등록		40-2019-0009735						
기술인증		21-055						

요 약

보고서 면수
39page

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>한우 수정란의 배양액 개선과 이식액 개발을 통한 수정란 생산 및 이식 효율증다 체외 배양 기술 개선과 이식 효율 향상을 통하여 우수한 공란우의 활용성을 극대화 시켜 소 사육농가의 소득증대와 수입육에 대한 차별화된 한우의 경쟁력을 확보하기 위한 한우 맞춤형 수정란 이식모델과 기술을 개발하고자 함</p>
<p>연구개발성과</p>	<p>가) 난자 세척 및 체외 성숙 배양액 개발 - 난소의 난포액은 성분을 분석을 통해 난소의 적정 PH와 삼투압을 확인 및 필요요건을 파악하고 외부 노출 시 변화를 최소화 시킬 수 있는 세척용액 (MK_WM)을 개발하였음. MK_WM을 바탕으로 OPU(생체 난자흡입술)기술에 이용 할 수 있는 MK_OPU 개발을 진행하였으며, 난자 채취 동안 발생하는 출혈로 인한 혈액응고의 위험을 방지하기 위하여 항응고제 첨가 하여 난자에 손상 최소화 시킬 수 있도록 함</p> <p>나) 체외 수정 및 동결정액 세척용액 개발 - 체외 수정 배양액은 정액의 운동성 향상, 수정능 획득과 정자가 난자에 침투하는 메커니즘의 연구를 진행하였으며 주로 수정과정에서 이용되고 있는 TALP 배양액을 보완하여 개발하였음. 체외 수정 (MK_IVF) 배양액을 기반으로 동결 정액 세척 시 동결용액에 포함된 정자 활동 저해물질들을 제거하고 정액의 운동성을 향상 시킬 수 있는 성분 첨가하여 개발하였음</p> <p>다) 수정란 배양 용액 개발 - 수정이 완료된 수정란은 분열을 시작하여 착산 전까지 체외 배양을 시키며, 2cell부터 최종적으로 Blastocyst(배반포)까지 배양이 되어 수정란 이식 및 동결/저온 보존이 진행됨. 수정란이 발달이 진행되는 단계별로 필요로 하는 영양성분 및 성장인자, 호르몬등이 변화되며 Blastocyst에 가까워질수록 더욱더 많은 성분들이 요구됨. 따라서 발달 단계를 2단계로 나누어 단계별 요구되는 성분들을 연구하여 체외 배양액(MK_IVC)을 개발하였음</p>

	<p>라) 체외 성숙 및 배양 배양액의 개선</p> <ul style="list-style-type: none"> - 수정란의 생산 후 보존을 위해 동결 및 저온보존이 기술을 이용하게 되는데 동결/저온 과정을 거친 수정란의 생존성을 향상시키기 위해 지질함량을 줄이는 연구를 진행하였음. 수정란의 지질 함량과 동결/저온 후 생존성의 명확한 대사 관계는 밝혀지지 않았으나, 수정란 내 지질 함량이 많은 경우 동결/저온 후 생존성이 감소하는 경향을 나타내었음. 체외 배양 시 혈청과 BSA를 첨가하는 것이 수정란의 발달을 향상시켜주는 하지만 수정란 내 지질 함량을 증가시켜 동결-해동 후 생존성이 감소되는 것을 볼 수 있었음. 항산화제로 사용되지만 지방산을 미토콘드리아 내부로 이동시키는데 관여해 지질 대사를 조절하는 기능을 하는 L-carnitine을 이용하여 수정란의 생존성 향상 연구를 진행하였음 <p>마) 저온 보존 용액의 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - 체외 수정란의 이식 효율 향상을 위해 복잡한 단계의 장기보관용 동결이 아닌 이식 적기에 맞출 수 있는 단기간 저장이 가능한 저온 보존 용액을 개발 하고자 함. 수정란을 이용하여 저온 보존이 가능한 용액을 개발하고 수정란 단계에 따른 저온 보존 후 생존성 확인하였고, 저온 보존의 효율을 높이기 위해 저온 보존 용액에 FBS와 BSA를 첨가하여 저온보존 후 배발달과 세포사멸을 측정하였음 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>1) 체외 배양 기술 개선을 통한 수정란 생산을 개선</p> <ul style="list-style-type: none"> - 체외 배양액을 개선하여 회수 난자 수 대비 수정란 생산효율을 향상 - 수정란 생산량 증가로 인한 고능력 공란우 활용성 증대 - 희귀 유전자원의 보존 및 증진에 활용 가능 - 농가에 이식을 통한 개량 및 소득 증대 기여 <p>2) 수태율 향상을 위한 수란우 맞춤 수정란 이식기술 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - 수정란의 저온보존 기술 개발을 통하여 수정란의 생존기간을 약 72시간 까지 증가시킴으로 신선수정란의 활용성을 높임 - 수란우 발정상태 맞춤 수정란 공급으로 수태율 향상을 기대할 수 있음 - 농가의 공태 일수에 감소에 따른 경제적 부담 감소 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>한우</p>	<p>수정란</p>	<p>수정란 이식</p>	<p>생체난자흡입술</p>	<p>체외배양</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>Korean native cattle</p>	<p>Embryo</p>	<p>Embryo Transfer</p>	<p>OPU</p>	<p>SNP</p>

< 목 차 >

1장 연구개발과제의 개요	1
1. 연구개발의 개요	
2. 연구개발 대상의 국내외 현황	
3. 연구개발의 중요성	
2장 연구수행 내용 및 결과	9
1. 연구개발의 최종 목표	
2. 연차별 개발목표 및 내용	
3. 연구개발의 추진전략 및 추진체계	
4. 연구개발 성과	
3장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	36
1. 연도별 연구목표	
2. 계획대비 달성도	
4장 연구결과의 활용 계획 등	38
1. 연구 성과의 활용분야 및 활용방안	
2. 기대성과 및 파급효과	
3. 추가 연구 필요성	
4. 타 연구에의 응용	
5. 기업화 추진방안	
붙임. 참고 문헌	39

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

1장. 연구개발과제의 개요

1. 연구개발의 개요

가. 연구개발 배경

- 최근 외국산 소고기의 수입 추진확대에 따른 수입쇠고기와의 경쟁력확보와 웰빙시대를 맞이하여 소비자의 요구에 부응하는 품질의 향상과 차별화 전략이 요구되고 있음
- 소득의 향상으로 인한 육류 소비의 증가로 고급육에 대한 수요도 증가하는 실정이며, 소비자의 기호를 충족시킬 뿐만 아니라 외국산 쇠고기와 경쟁력을 갖출 수 있는 기술개발이 필요
- 소의 효율적이고 지속적인 개량 및 농가소득 증대를 위해서는 수정란 이식기술의 활용도 및 효율성 높이는 것이 필요함. 즉 수정란 생산 효율성을 증대시킬 수 있는 시약 개발 및 수정란을 생산하고 이를 이식함으로써 농가 수익증대에 기여할 수 있음
- 체계적인 수정란 이식 프로그램의 부재로 말미암아, 수정란 이식 효율이 외국에 비해 현저히 낮고, 생산 체계가 미흡한 실정임
- 우량한 유전형질을 갖춘 개체의 체외수정란 생산 시 생산효율을 높이고 건강한 수정란을 생산하기 위해 체외수정과정과 방법들을 비교하여 최적의 우량 수정란 생산 체계 마련이 시급함

나. 연구개발 필요성

- 수정란 이식에서 수정란의 발육단계와 수란우의 적절한 조합, 이식방법의 재조명으로 수정란 이식이 최우선으로 해결해야 할 높고 안정적인 수태율과 분만율의 제고가 필요하며, 수정란이식에 이용되는 적절한 이식용 용액을 정립하여 표준화된 수정란 이식 프로그램 개발이 절실히 요구됨
- 이식한 수정란이 수란우의 자궁에 적응하여 착상이 되는 것은 수정란 이식의 성패를 좌우하는 중요한 요인으로 수정란과 수란우의 발정일 동기화는 매우 중요함. 일반적으로 발정일차가 ± 1 일의 범위로 수란우를 공용하고 있지만, 수란우 맞춤형 수정란 이식 체계를 향상시키면, 수정란 이식후 산자 생산율의 획기적인 향상을 얻을 수 있음
- 최근의 생명공학분야의 발전을 토대로 축산업계 또한 무한경쟁 체제에 돌입하였으며 이러한 새로운 환경에 보다 능동적으로 대처하기 위하여서는 다양한 신기술의 산업적인 적용이 필수라고 사료됨. 본 연구는 수정란 이식 프로그램을 수립하고자 함
- 따라서 주요 연구사항은 수란우 맞춤형 수정란 이식 기술 프로그램 개발을 위한 1) 배양 기술 개선을 이용한 수정란 생산 효율 향상, 2) 수정란 이식 효율 향상을 위한 수정란의 장기보존 기술 개발의 적용임

다. 연구개발 목표

- 체외 배양 기술 개선을 통하여 유전능력이 우수한 고능력 공란우를 활용성을 극대화시키고, OPU 기술을 이용 생체 내 난자를 채취하여 우수한 수정란을 장기보존 기술 개발을 통한 수란우 맞춤형 수정란 이식체계를 확립하여 고능력 송아지 생산율을 높임으로

써 우량 유전자원을 확보, 보존 및 유지 시키고, 나아가 고급육 생산 체계를 갖추어 **한우 사육농가의 소득 증대와 수입육에 대한 차별화된 한우의 경쟁력을 확보**하기 위한 모델과 기술을 개발하고자 함

라. 연구개발 방법

1) 체외배양(In Vitro Culture)액 개선 프로그램 개발

- 현재 수정란 생산 과정에서 체외배양은 매우 중요한 과정 중에 하나 임. 체외배양 시스템이 성공적으로 구축되어 있어야 이후 수정란 이식 및 수정란 동결과정이 이루어 질 수 있음. 체외배양 시스템이 제대로 구축되어 있지 않다면 수정란 생산을 자체가 매우 낮거나 수정란 질 자체가 떨어져 이식이나 동결에 이용을 할 수 없고 사업이 진행될 수 없음
- 소 수정란의 경우 배양기에서 수정 후 약 7일간 배양이 이루어지고 이시기에 세포분화를 하며 성장함. 대부분의 체외배양 시스템은 한 가지 배양액으로 7일간 배양을 실시하고 있음. 수정이 이루어지고 세포가 2세포기 4세포기 분화를 지속하며 32세포기를 지나면 이시기부터 수정란은 세포분화를 위해 많은 양에 에너지를 필요로 하게 됨. 이때 충분한 에너지를 공급하지 못하면 건강한 수정란으로 자라나기가 어려움
- 한 가지 배양액으로 배양을 하는 이전 시스템의 경우 위 시기 에너지 공급이 충분히 이루어지기 어려움. 따라서 이 과정을 두 과정으로 분리하여 배양액을 각각 만들어 사용하고자 함
- 첫 번째 과정의 배양액은 기존 배양액을 이용해서 체외배양을 실시하고 두 번째 과정의 배양액에는 수정란이 세포분화 시 에너지원으로 사용 할 수 있는 성장인자를 첨가 하고자 함. 성장인자에는 세포 성장과 분화를 자극하여 생존성을 높여주는 growth factor를 첨가하고자 함. 또한 항산화 작용과 베타 옥시데이션 활성화라는 dual effect를 가지는 첨가제를 개발하여 수정란의 성장과 동결 후 생존성을 높여주고자 함

2) 수정란 이식 효율 향상 프로그램 개발

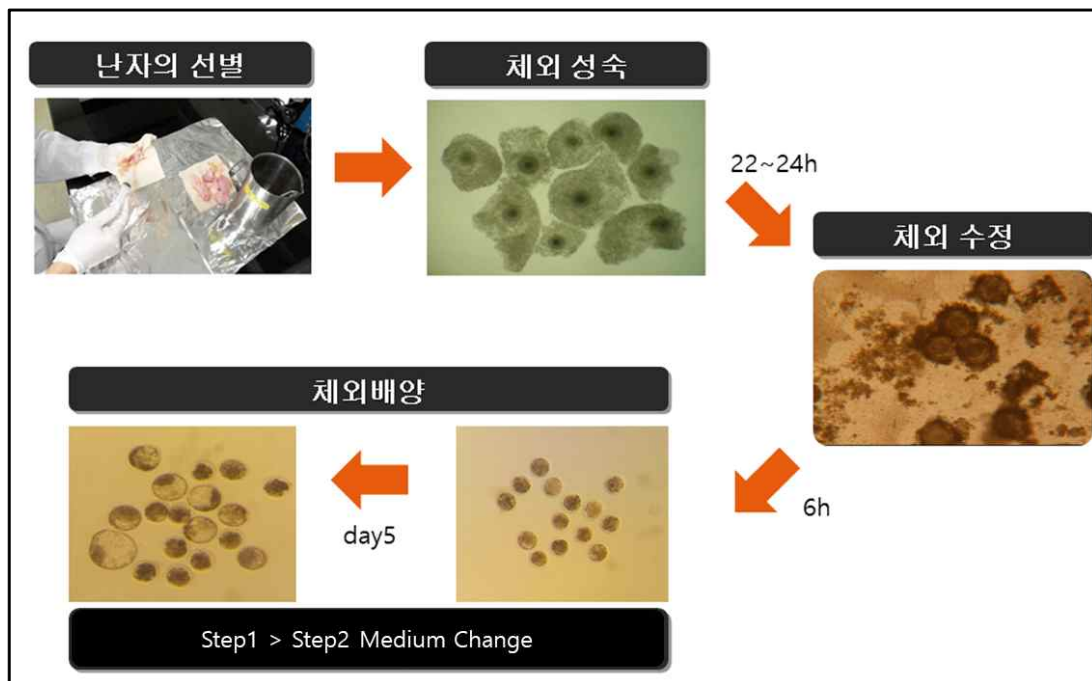
- 기존 체외에서 생산된 신선수정란의 경우 수정란 이식시 수정란의 생존성이 12시간 내외로 짧아 연구자 및 수정사들이 수정란 생존시간에 맞추어 실험 및 이식을 할 수 밖에 없었음. 따라서 수란우의 수태율에 큰 영향을 미치는 수란우 발정상태를 정확히 맞추어 이식 하기는 힘든 환경이었음
- 수란우 상태에 맞춘 수정란 이식을 실시하기 위해서는 더 많은 공란우에서 난자를 채취하고, 매일 실험이 실시되어야 함. 또한 이식하는 수정사들도 발정동기화시 수란우 발정상태가 하루 이상 차이가 나는 경우는 수정란 이식을 할 수 없어 이식 두수를 맞추기 위해 더 많은 수란우를 발정동기화 할 수 밖에 없었음. 수정란 이식에 참여하는 농가들은 가임수란우를 더 많이 준비해야 해서 금전적 손해를 감수하고 이식에 참여 할 수밖에 없었음
- 본 연구에서는 위에 문제를 해결하기 위해 **신선수정란의 생존성을 증가시켜 연구자 및 수정사, 참여농가들의 시간적 경제적 손해를 줄이고자 함**
- 수정란의 생존성을 높이는 방법 중에 하나는 세포분화를 억제하는 것임. **세포분화를 억**

제한으로써 수정란이 운송 도중 투명대에서 탈피가 되는 것을 막고 수정란이 소모하는 에너지를 줄이 수 있음

- 수정란의 세포분화를 억제하는 방법은 수정란 생존 온도변화와 수정란 이식액에 세포분화 억제 물질을 첨가 하는 것임
- 일반적인 소 수정란의 체외 생존 온도는 38.5℃내외로 알려져 있음. 이온도에서 수정란은 지속적으로 분화하고 성장을 계속함. 때문에 38.5℃에서 수정란 이식이 이루어지고 수정란은 이송 과정 중에 지속적으로 세포분화 및 성장을 하게 되어 수란우의 발정상태에 맞춘 이식은 어려워지게 되고 수정란 자체도 이송과정 중 에너지를 소모하여 생존성이 약화 됨
- 수정란 보관 및 이송 시 수정란 이식액의 온도를 약 4~10℃로 낮추어 수정란이 성장하는 것을 억제하고자 함
- 수정란 이식액은 pH의 변화를 억제해주어 세포를 보호하는 역할을 하는 물질을 첨가하고 세포분화를 억제하고, 외부 온도변화에 대한 내성을 높여주는 효과가 있는 첨가제를 활용 하고자 함

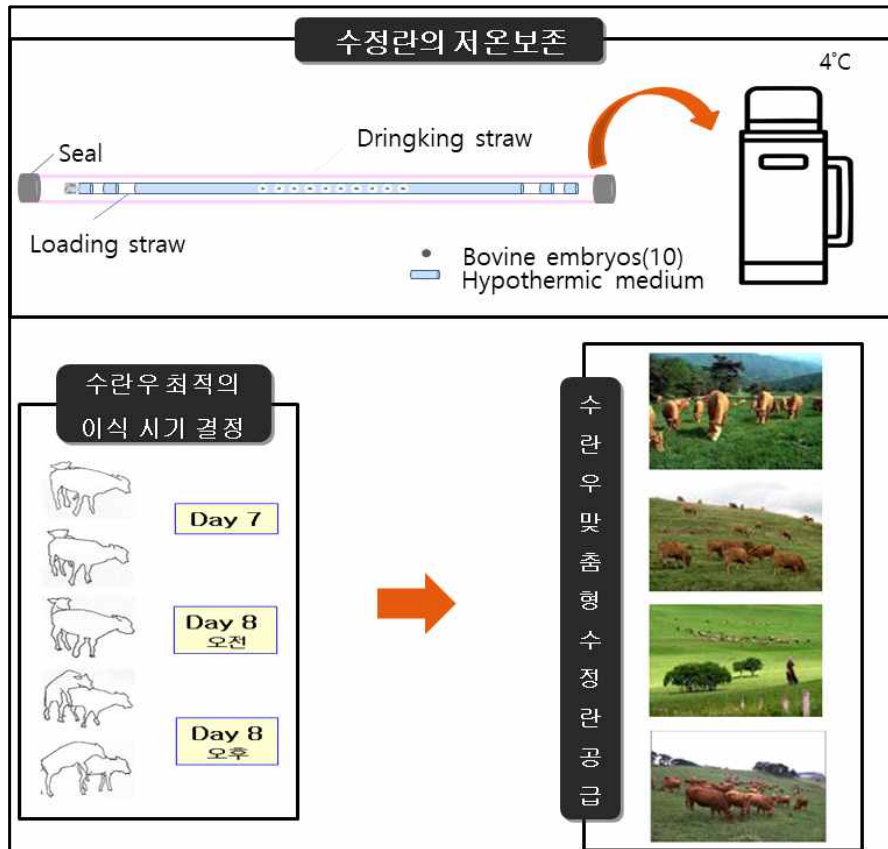
마. 연구개발 개요

1) 체외배양 프로그램 기술 개요



<그림 1> 체외배양 프로그램 개요

2) 수정란이식 향상 프로그램 기술 개요



〈그림 2〉 수란우 맞춤형 이식 프로그램

2. 연구개발 대상의 국내·외 현황

가. 국내 기술 수준 및 시장 현황

1) 기술현황

가) 국내 수정란 생산

- 국가 기관 및 일반 연구소 등 국내 약 30곳 연구시설에서 체내 및 체외 수정란이 생산되고 있음
- 체외배양의 기술적인 문제로 체내 수정란이 많이 생산되었으나, 현재 많은 기관이나 연구소에 체외 배양에 대한 기술이 요구되고 있음

나) 체외 수정란

- 체외 수정란은 국내 약 10곳의 기관에서 생산 중이며 대부분이 도축 난소유래 수정란을 생산하고 있고 일부(자사 포함) 연구기관에서 OPU기술을 이용한 수정란을 생산하고 있음
- 최근 체외 배양 기술 발달에 따라 국내 시장이 체내 수정란에서 체외 수정란으로 급격히 시장이 변화 하고 있음

다) 체외 수정란 생산 배지

- 국내 체외 수정란 생산에 사용되는 배지는 약70% 이상이 미국, 일본, 유럽등에서 생산되는 외산 배지를 수입해 사용하고 있고, 나머지 30%는 자체 생산 배지를 사용하고 있어 국내 유통되고 있는 국산 배지는 전무한 상황임
- 외산 배지의 경우 주문 후 배지를 받는데 평균 1개월 이상이 소모되어 이를 사용하는 기관 및 연구소에서는 수정란 생산량 및 수정란 생산에 따른 배지 소비량을 예측하여 주문을 하고 있음
- 하지만 국내 시장의 경우 계절에 따른 소비량, 사업에 따른 소비량에 대한 변화폭이 커 배지 사용에 대한 소비량을 예측하기 쉽지 않아 일반적으로 소비량 보다 많은 양의 배지를 주문하고 만약 배지 기간이 다하게 되면 대부분 폐기를 하고 있음
- 수입 배지의 경우 가격의 비싸 수정란 생산 단가를 높이는 원인이 되고 있음

2) 시장현황

가) 국내 수정란 생산

- 국내 수정란 생산 시장의 경우 최근까지 체내 수정란 생산 비율이 높았으나, 세계적인 추세에 발맞추어 국내 시장도 체외 수정란 생산 비율이 빠르게 높아지고 있음
- 국내·외 연구자들의 많은 교류로 인해 해외 기술의 유입이 빨라지고 국내 연구 수준의 향상으로 체외배양 기술이 급격히 높아지고 있음
- 체외수정에 가장 문제가 되었던 수태율이 높아짐에 따라 농가 및 시장의 반응이 체외수정란에 대한 긍정적인 시선으로 변화하고 있음

나) 체외 수정란 생산 배지

- 국내 수정란 생산 기관이 대부분 수입산 배지를 수입해와 사용하고 있고, 나머지 기관들은 자체적으로 수정란 생산 배지를 만들어 사용하고 있어 국내 체외 수정란 생산용 배지는 전무한 상황임
- 수입산 배지의 경우 수입업체 중계업체등 판매 단계가 복잡하여 판매 단가 자체가 매우 높고, 주문 후 배지를 받는데 최소 1개월 이상이 소모되어 배지 사용에 제한이 있음
- 국내 배지의 경우 판매를 하고 있는 업체가 없어 수정란 생산 기관에서 국내 배지를 구입하고 싶어도 할 수 없는 상황임

3) 경쟁기관현황

가) 수정란 생산 국가 기관

- 국가 기관의 경우 매년 일정량의 체내 및 체외 수정란을 생산하고 있으나 국내 소비량에 비해 공급량이 많이 부족한 상황임
- 또한 수정란 생산 시 대부분 국외 배지를 사용하고 있어 수정란 생산에 따른 비용이 상승되고 있음

나) 수정란 생산 일반 기관

- 일반 기관의 경우 수입산 배지를 사용하게 되면 단가 상승을 피할 수 없어 대부분 자체

생산 배지를 사용하고 있고, 자체 생산 배지를 사용함으로써 각 기관마다 기술차이가 크게 나타남

- 대부분의 기관이 자체 생산 배지를 사용하고 있으나 기술유출이나 생산시설 미비로 인해 판매를 하지 못하고 있는 상황임

다) 체외수정란 생산 배지

- 국내 생산 판매하는 기관 및 업체가 없음
- 수입산 배지를 판매하는 수입업체가 있으나 대부분 판매만 하고 이후 사용 방법에 대한 교육이 없어 수정란 생산하는 기관에서 자체적으로 기술을 습득해야 하는 어려움이 있음

4) 지식재산권현황

가) 소 수정란 생산 방법

- 국내 소 수정란 생산 방법에 관한 특허는 ‘소 수정란의 체외 생산방법(2010)’, ‘소 복제 수정란의 체외배양 방법’ 등 6건 정도가 있고, 한우 수정란에 대한 특허는 ‘수정란 이식기술을 이용한 고능력 한우의 대량생산방법’, ‘개체별 혈통이 확립된 한우 체외수정란의 생산방법 및 이의 이식방법’ 2건 이 있음
- 수정란 생산 배지에 관한 특허는 ‘수정란의 체외배양용 배지 조성물 및 이를 이용한 체외배양 방법’ 1건이 등록되어 있음

나. 국외 기술 수준 및 시장 현황

1) 기술현황

가) 세계 수정란 생산

- 소 수정란 이식은 1970년대 초 캐나다에서 실용화 된 후, 북미와 유럽을 중심으로 많은 발전을 이루어 왔음. 소에서 수정란 이식은 유전적인 능력개량의 수단으로 폭 넓게 활용되었음 즉 능력이 우수한 공란우를 과배란 처리, 수정란을 회수하여 능력이 낮은 집단에 이식, 우수한 능력을 보유하고 있는 송아지를 일시에 다량 생산하여 집단의 능력을 조기에 개량하는 MOET(Multiple Ovulation and Embryo Transfer)방법이 이용되고 있음
- 과배란처리에 의한 체내수정란의 생산은 공란우 개체, 처리계절, 호르몬 등에 따라 변이가 많아 수정란 확보에 문제점으로 대두되고 있음. 이에 최근에는 혈통 및 능력이 확인된 공란우로부터 초음파진단기를 이용해 생체난자채취(OPU; Ovum Pick Up)기법에 의한 미성숙 난포란을 반복적으로 채취하며, 채취된 난자의 체외수정·배양으로 체외수정란을 생산하는 기술이 적용되고 있음

2) 시장현황

가) 세계 수정란 생산

- 최근 세계적으로 이식된 체내수정란은 66만221개이며, 그중 북미에서 28만3487개를 이식해 42.9%를 차지했고, 캐나다 6만7522개(10.2%), 일본 10만3872개(15.7%), 한국 5367개(0.8%)가 이식됐음.

- 체내수정란의 경우 두당 수정란 생산 개수가 6.55개였고 일본이 7.5개로 세계 평균보다 높게 나왔음
- 일본은 1만3835두의 공란우에서 수정란을 회수해 10만3872개의 수정란을 이식함으로써 아시아에서 수행된 체란두수의 대부분을 이식 체내수정란의 94.9%를 차지하고 있음
- 세계 각국에서 OPU수정란은 61만2709개가 생산됐으며, 그중 브라질이 35만3539개를 생산함으로써 세계의 57.7%를 차지하고 있음. 다음은 미국에서 19만7958개가 생산돼 32.3%를 차지하고 있고 OPU수정란의 생산은 남미와 북미에서 집중적으로 이뤄지고 있음
- 체내 수정란의 경우 60만개 정도를 유지하고 있음에도 불구하고 전 세계 수정란 생산량은 빠르게 늘어나고 있고 있음.
- OPU IVP 수정란 생산량이 급격히 늘어나고 있기 때문에 2015년 결과에서는 체내 수정란과 OPU IVP 수정란의 생산 개수 차가 약 5만개로 좁아졌음
- 향후 몇 년 안에 OPU IVP 수정란이 체내 수정란을 따라 잡을 것으로 예상 됨

〈표 1〉 세계 체내 수정란 생산 현황 2015년

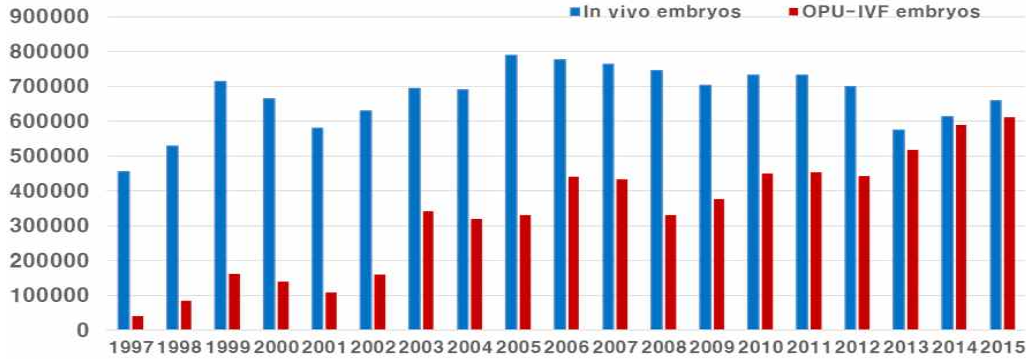
국 가	체란횟수(A)	이식가능 수정란수(B)	두당평균(B/A)	수정란수비율(%)
세 계	100,739	660,221	6.55	100
미 국	41,946	283,487	6.76	42.94
캐 나 다	10,128	67,522	6.67	10.23
일 본	13,835	103,872	7.5	15.73
한 국	803	5,367	6.68	0.81

세계 225개국 중 50개국 제출 자료 (IETS, 2016)

〈표 2〉 세계 OPU IVP 수정란 생산 현황 2015년

국 가	공란우 두수	회수 난자수	이식 가능 수정란수	수정란수비율(%)
세 계	75,839	2,061,205	612,709	100
미 국	32,636	650,510	197,958	32.31
캐 나 다	2,279	21,908	9,038	1.48
브 라 질	50,980	1,106,464	353,539	57.7
일 본	2,453	45,368	6,458	1.05
한 국	724	13,856	2,982	0.49

세계 225개국 중 50개국 제출 자료 (IETS, 2016)



〈그림 3〉 세계 수정란 생산 현황 2015년까지

(IETS, 2016)

3) 경쟁기관현황

- 미국 Trans Ova의 경우 미국 수정란 생산의 80%이상을 생산하고 있으며, OPU유래 수정란을 생산하고 동결 및 이식을 하고 있음
- 브라질 WTA의 경우 브라질 수정란 생산량의 약 60%이상을 생산하고 있고, 전세계에서 OPU 수정란을 가자 많이 생산하고 있음. 따라서 OPU 유래 수정란 생산에 소요되는 장비나 생산 시스템이 가장 발달되어 있음

4) 표준화현황

- 일본 IFP에서 수정란 생산용 배양액 판매 중
- 유럽 IMV에서 수정란 생산용 배양액을 판매 중

3. 연구개발의 중요성

가. 연구개발의 차별성 및 중요성

- 국내 수정란 생산 시장의 경우 위에 서술한 바와 같이 70%이상이 외산 수입 배지에 의존 하고 있음. 수입 배지를 사용함으로써 국외로 자금이 유출되는 우려가 있고, 배지 판매 단가가 높아 수정란 생산비용이 상승하는 원인이 되고 있음
- 수입산 배지를 사용하는 기관의 경우 국내산 배지를 사용하고 싶어도 국내에서 수정란 생산용 배지를 만들어서 판매하는 곳이 없어 실제적으로 자체 수정란 생산용 배지를 생산하지 않는 곳이라면 수입산 배지를 사서 사용할 수밖에 없는 실정임
- 따라서 수입산 배지를 대체 할 수 있는 국내산 한우 맞춤형 수정란 생산 배지 개발이 절실 한 상황임. 또한 한우 맞춤형 수정란 이식용 배지를 개발하여 수정란 생존 시간을 증가시켜 수정란에 활용 폭을 증가시킴으로써 수정란 이식 사업에 편의를 돕고 수정란의 발달 단계와 수란우의 발정 주기를 동기화하여 수정란 이식에 대한 수태율 향상이 필요함

2장. 연구수행 내용 및 결과

1. 연구개발의 최종 목표

가. 최종목표

- 체외 배양 기술 개선을 통하여 유전능력이 우수한 고능력 공란우를 활용성을 극대 화시키고, OPU 기술을 이용 생체내 난자를 채취하여 우수한 수정란을 저온보존 기술 개발을 통한 수란우 맞춤형 수정란 이식체계를 확립

- 1) 미성숙 난자 세척용 배지 개발
- 2) OPU 난자 세척용 배지 개발
- 3) 체외성숙 배지의 개발
- 4) 동결정액 세척용 배지 개발
- 5) 체외수정 배지의 개발
- 6) 체외배양 배지의 개발
- 7) 수정란 이식용 배지의 개발

- 총 7종의 한우 맞춤형 수정란 생산 배지 개발 예정

나. 세부목표

1) 미성숙 난자 세척용 배지 개발

- 도축장유래 난소에서 주사기를 통해 얻어진 난자의 세척에 사용하는 배지 개발
- 일반적으로 단계별 세척에 사용가능
- 체외에서 PH의 변화를 억제해 줄 수 있는 시약을 사용하여 개발

2) OPU 난자 세척용 배지 개발

- OPU 방법을 이용하여 살아 있는 소의 난소에서 얻어진 난자의 세척에 사용하는 배지 개발
- 난소의 획득 과정에서 얻어지는 혈액의 응고를 막기 위한 시약을 사용하여 개발

3) 체외 성숙 배지의 개발

- 미성숙 난자의 성숙에 필요한 체외 성숙 배지의 개발
- CO₂ 배양기를 이용하여 체외에서 22시간 성숙을 시킴
- 체외 성숙에 필요한 FSH, LH 종류의 호르몬을 사용

4) 동결정액 세척용 배지 개발

- 체외수정 시 동결 정액의 세척에 사용되는 배지의 개발
- 정자의 활력이나 생존성에 영향을 미치지 않는 배지의 개발

5) 체외수정 배지의 개발

- 성숙된 난자와 세척이 완료된 정자의 수정에 사용되는 배지의 개발
- 수정능력 획득에 필요한 시약을 사용하여 배지 개발

6) 체외배양 배지의 개발

- 체외에서 수정란이 생존하고 분화 할 수 있게 해주는 배지의 개발
- 수정란의 분화 단계에 따라 2단계로 나누어 배지 개발

7) 수정란 이식용 배지의 개발

- 완성된 수정란에 이송 및 이식에 사용되는 배지의 개발
- 수정란의 세포 분화를 억제하여 수정란의 생존성을 증가
- 저온 보존 기술을 이용하여 수정란 생존시간 증가
- 수정란의 생존 시간 증가에 따른 활용도 증가

2. 연차별 개발목표 및 내용

가. 1차년도

1) 개발 목표

- 주관연구기관((주)엠케이바이오텍) : 체외수정란 생산용 3종의 배지 개발
- 동연구기관(충남대학교 산학협력단) : 체외수정란 생산용 3종 배지 개발 실험

가) 난자 세척용 배지 개발 실험

- 난자 세척에 사용되는 배지 개발 실험
- 도축 유래 난소에서 난자를 획득, 이후 세척과정과 성숙과정을 거쳐 성숙을 확인

나) OPU 세척용 배지 개발 실험

- OPU 시 사용되는 난자 임시 보관용 배지 개발실험
- OPU를 실시 살아있는 소에서 난자를 획득, 이후 세척과정과 성숙과정을 거쳐 성숙을 확인

다) 체외성숙용 배지 개발 실험

- 세척된 미성숙 난소의 성숙에 사용되는 배지 개발 실험
- 체외성숙에 필요한 호르몬 첨가

나. 2차년도

1) 개발 목표

- 주관연구기관((주)엠케이바이오텍) : 체외 수정란 생산용 배지 4종 개발
- 협동연구기관(충남대학교 산학협력단) : 체외 수정란 생산용 배지 4종 개발

가) 동결정액 세척용 배지 개발 실험

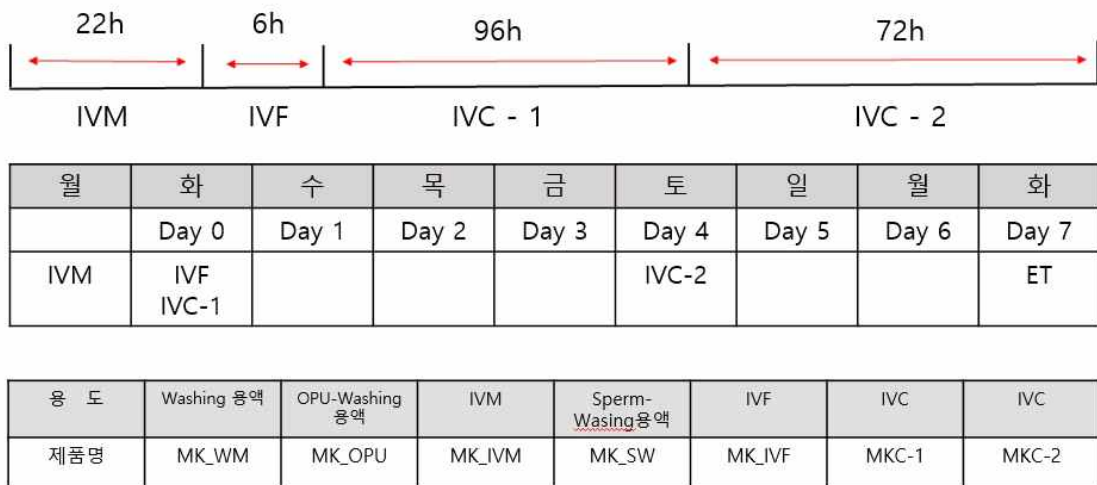
- 동결정액 희석 및 세척에 사용하는 배지의 개발 실험
- 해동 후 정자의 운동성 및 직진성, 활력등 평가

나) 난자 및 정자 수정용 배지 개발 실험

- 성숙을 마친 난자와 정자를 수정할 때 사용하는 배지 개발 실험
- 정자의 수정능획득 및 수정율을 평가

다) 수정란 배양용 배지 2종 개발 실험

- 수정을 마친 수정란의 배양에 사용되는 배지 개발 실험
- 수정란 발달 단계에 따라 2단계에 걸친 배양 배지 개발 실험
- 수정란 생산을 평가



<그림 4> 개발 실험 스케줄 표 및 제품명

3. 연구개발의 추진전략 및 추진체계

가. 연구개발 추진전략 및 방법

- 기 보유한 충남대학교 번식학 실험실의 수정란 생산 기술 과 수정란 이식 기술을 기반으로 수정란 생산 배지를 개발함
- 엠케이바이오텍에서는 수정란 이식 배지의 성능에 대한 평가를 담당
- 충남대학교 번식학실험실에서는 수정란 생산용 배지의 생산 및 비교 실험을 담당
- 엠케이바이오텍에서 수정란 생산에 필요한 배지의 종류 및 실험 방법 평가에 대한 자료를 제공
- 난자 세척에 필요한 배지

연구개발명	난자 세척에 필요한 배지
배 지 명	MK_WM
용 량	500ml

- OPU 체란에 필요한 배지

연구개발명	OPU 체란에 필요한 배지
배 지 명	MK_OPU
용 량	500ml

- 체외성숙에 필요한 배지

연구개발명	체외성숙에 필요한 배지
배 지 명	MK_IVM
용 량	50ml x 2

- 정액 세척에 필요한 배지

연구개발명	동결정액 세척에 필요한 배지
배 지 명	MK_SW
용 량	100ml x 2

- 난자 및 정자 수정에 필요한 배지

연구개발명	체외수정에 필요한 배지
배 지 명	MK_IVF
용 량	50ml x 2

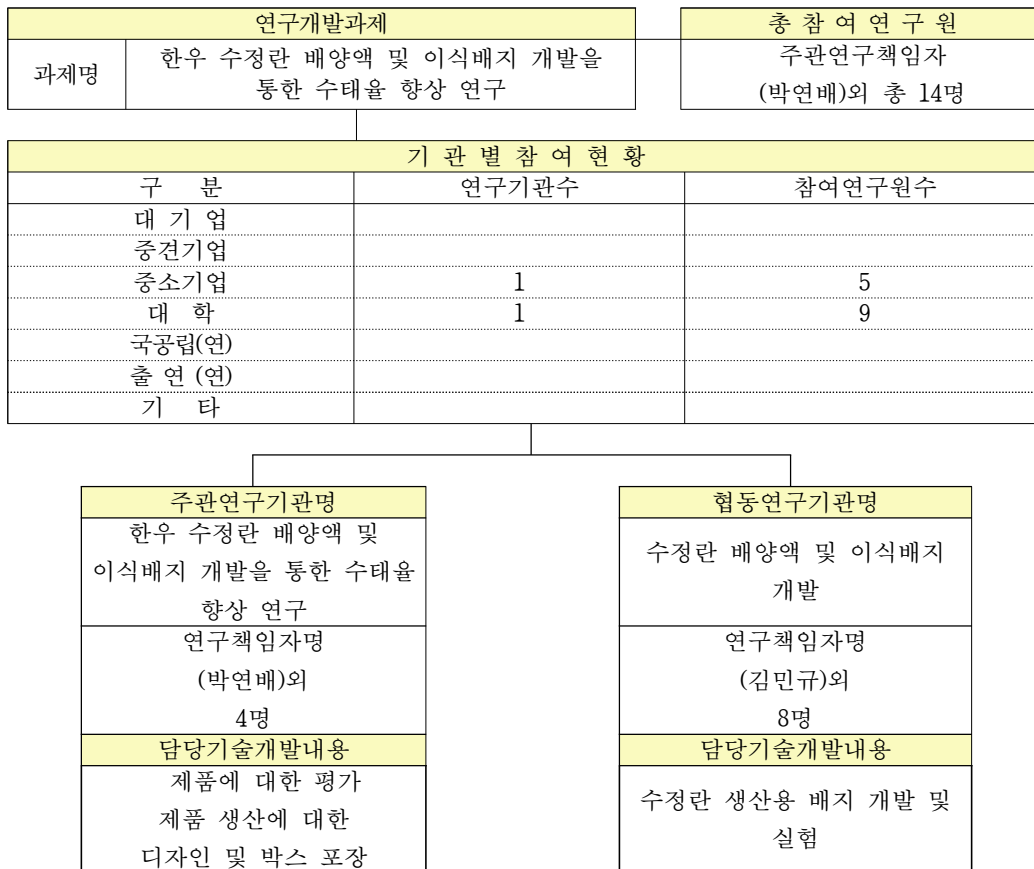
- 수정란 생산에 필요한 배지

연구개발명	수정란 배양에 필요한 배지1
배 지 명	MKC-1
용 량	50ml

연구개발명	수정란 배양에 필요한 배지2
배 지 명	MKC-2
용 량	50ml

나. 연구개발 추진체계

- 엠케이바이오텍(주관기관)에서는 수정란 생산에 필요한 배지 7종에 대한 용량 및 명칭, 성능평가 진행 방법 등을 제공하고, 충남대학교 번식학실험실에서 주관기관에서 제공한 정보를 바탕으로 수정란 생산 배지 7종에 대한 실험 및 평가를 진행



다. 연구개발 추진일정

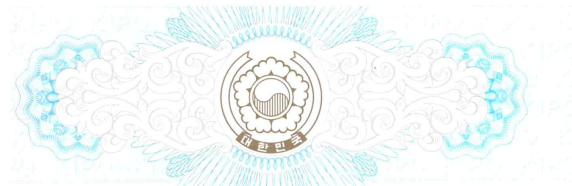
1차년도															
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	제품명 및 평가방법					■								100,000	김민규 (충남대학교)
2	난자세척 배지 개발						■	■	■	■	■	■			
3	OPU 체란 배지 개발						■	■	■	■	■	■			
4	난자 체외성숙 배지 개발							■	■	■	■	■			
2차년도															
1	동결정액 세척용 배지개발	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	134,000	김민규 (충남대학교)
2	난자 및 정액 수정용 배지 개발	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		
3	체외배양 배지 2종 개발		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		
4	수정란 이식용 배지 개발			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		

4. 연구개발 성과

가. 연구개발성과

1) 기술이전

종 류	고안의 명칭	등록번호	등록일	발의자 (고안자)	특허 또는 실용실안권자	전 용 실시권자
기술이전	수정란 이식기술을 이용한 고능력 한우의 대량 생산방법	10-1390536	2014.04.23	김민규	(주)엠케이 바이오텍	(주)엠케이 바이오텍



특 허 증

CERTIFICATE OF PATENT

특 허 제 10-1390536 호 출원번호 제 2013-0033861 호
(PATENT NUMBER) (APPLICATION NUMBER)
출원일 2013년 03월 28일
(FILING DATE:YY/MM/DD)
등록일 2014년 04월 23일
(REGISTRATION DATE:YY/MM/DD)

발명의명칭 (TITLE OF THE INVENTION)
수정란 이식기술을 이용한 고능력 한우의 대량생산방법

특허권자 (PATENTEE)
등록사항란에 기재

발명자 (INVENTOR)
등록사항란에 기재

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 04월 23일



특 허 청 장 김 영
COMMISSIONER, THE KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE



연차등록료는 2017년부터 매년 04월 23일까지 납부하여야 하며 등록위부관 관리과계를 확인바랍니다

<그림 5> 기술이전을 통한 전용실시권 확보

2) 특허성과

종 류	고안의 명칭	등록번호	등록일	발의자 (고안자)	특허 또는 실용실안권자	전 실시권자
특허출원	각각의 수정란을 공동배양 할 수 있는 배양 접시	10-2019-0038371	2019.04.02	김민규	(주)엠케이 바이오텍	(주)엠케이 바이오텍
특허출원	개체 배양이 가능한 수정란 배양 접시	10-2019-0038368	2019.04.02	김민규	(주)엠케이 바이오텍	(주)엠케이 바이오텍

관인생략

출원 번호 통지서

출원 일자 2019.04.02
 특 기 사 항 심사청구(유) 공개신청(무)
 출원 번호 10-2019-0038368 (접수번호 1-1-2019-0337349-92)
 출원인 명칭 주식회사 엠케이바이오텍(1-2018-069144-1)
 대리인 성명 김준연(9-2010-000141-8)
 발명자 성명 김민규 박연배 김병호 이진희 김태영 박길선
 발명의 명칭 개체 배양이 가능한 수정란 배양 접시

특 허 청 장

<<안내>>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 통보된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 0131(가령코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경장), 정정신청서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허-실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr/특허/마우-PCT/마드리드>
※ 우선권 인정기간 : 특허-실용신안은 12개월, 상표-디자인은 6개월 이내
 ※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB-39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 출원인이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허가결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.
8. 기타 심사 절차에 관한 사항은 통보된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

관인생략

출원 번호 통지서

출원 일자 2019.04.02
 특 기 사 항 심사청구(유) 공개신청(무)
 출원 번호 10-2019-0038371 (접수번호 1-1-2019-0337398-18)
 출원인 명칭 주식회사 엠케이바이오텍(1-2018-069144-1)
 대리인 성명 김준연(9-2010-000141-8)
 발명자 성명 김민규 박연배 김병호 이진희 김태영 박길선
 발명의 명칭 각각의 수정란을 공동배양 할 수 있는 배양 접시

특 허 청 장

<<안내>>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 통보된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 0131(가령코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경장), 정정신청서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허-실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr/특허/마우-PCT/마드리드>
※ 우선권 인정기간 : 특허-실용신안은 12개월, 상표-디자인은 6개월 이내
 ※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB-39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 출원인이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허가결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.
8. 기타 심사 절차에 관한 사항은 통보된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

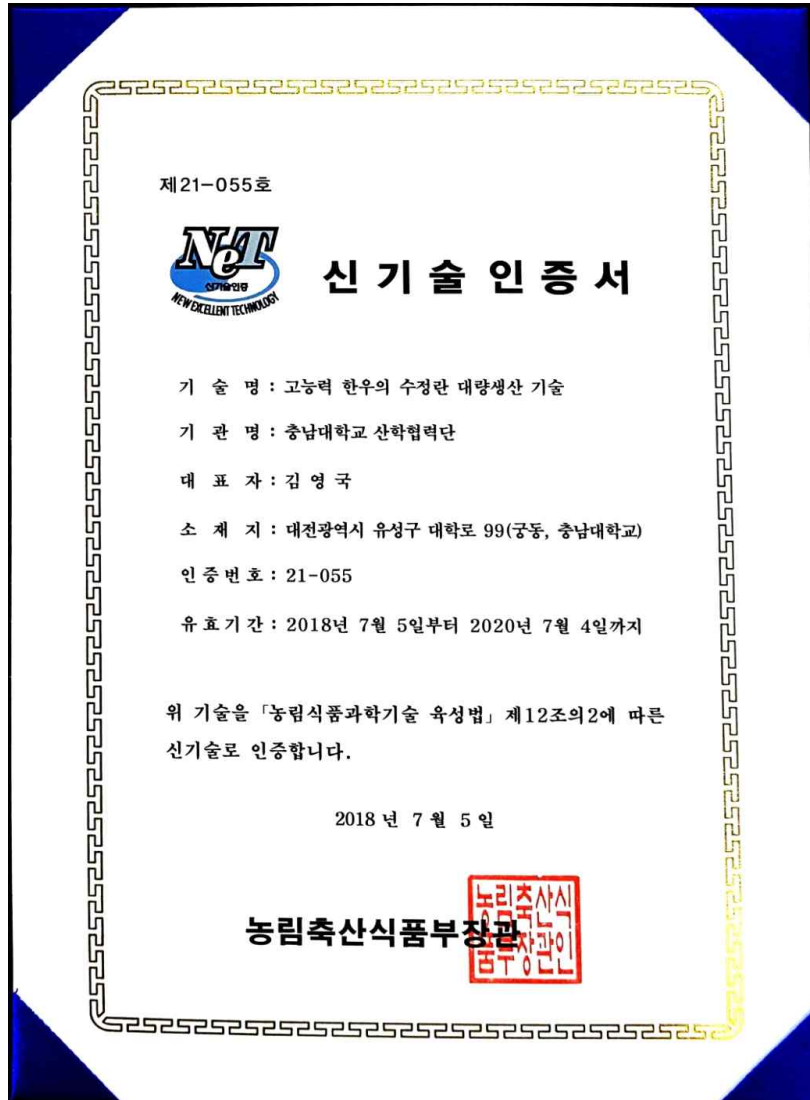
<그림 6> 수정란생산 전용 배양용기 특허 출원

3) 상표등록

종 류	고안의 명칭	등록번호	등록일	발의자 (고안자)	특허 또는 실용실안권자	전 용 실시권자
상표등록	MK_IVP Series	40-2019-00 09804	2019-01-18	김민규	(주)엠케이 바이오텍	(주)엠케이 바이오텍
상표등록	MK biotech	40-2019-00 09735	2019-01-18	김민규	(주)엠케이 바이오텍	(주)엠케이 바이오텍

4) 기술인증

개발기술명	용도 및 적용 분야	개발기간	비 고 (제품화 및 기술인증)	지원기관
한우 수정란 배양액 및 이식배지 개발을 통한 수태율 향상 연구	한우 수정란 생산 및 이식 효율 증대	2018~2019	제품화 완료 신기술 인증	농림축산 식품부



<그림 7> 수정란생산관련 신기술 인증

나. 연구개발 결과

1) 기술적 성과

가) 난자 세척 및 체외 성숙 배양액 개발

- 난소의 난포액은 성분을 분석을 통해 난소의 적정 PH와 삼투압을 확인 및 필요요건을 파악하고 외부 노출 시 변화를 최소화 시킬 수 있는 세척용액 (MK_WM)을 개발하였음. MK_WM을 바탕으로 OPU(생체난자흡입술)기술에 이용 할 수 있는 MK_OPU 개발을 진행 하였으며, 난자 채취 동안 발생하는 출혈로 인한 혈액응고의 위험을 방지하기 위하여 항 응고제 첨가 하여 난자에 손상 최소화 시킬 수 있도록 하였음
- 체외 성숙에 이용되고 있는 배양액 조사 및 난자의 성숙관련 인자 분석을 통하여 이를 기반으로 MK_IVM 배양액을 개발하였으며, MK_WM, MK_OPU 배양액을 통한 난자 세척 과정 후에 MK_IVM과 기존 수입 IVM과의 비교실험을 진행하였음
- 성숙된 난자의 비율을 비교해 보면 MK 배양액이 81.4%, A사 배양액이 76.9%, I사 배양액이 71.7%로 MK 배양액으로 통해서 체외성숙 진행하였을 때 가장 성숙 난자의 비율이 높게 나타났음

〈표 3〉 IVM 제품별 성숙율

	No. of oocyte	No. of matured oocyte	maturation rate (%)
MK IVM	1782	1450	81.4
A사 IVM	1711	1315	76.9
I사 IVM	1799	1290	71.7

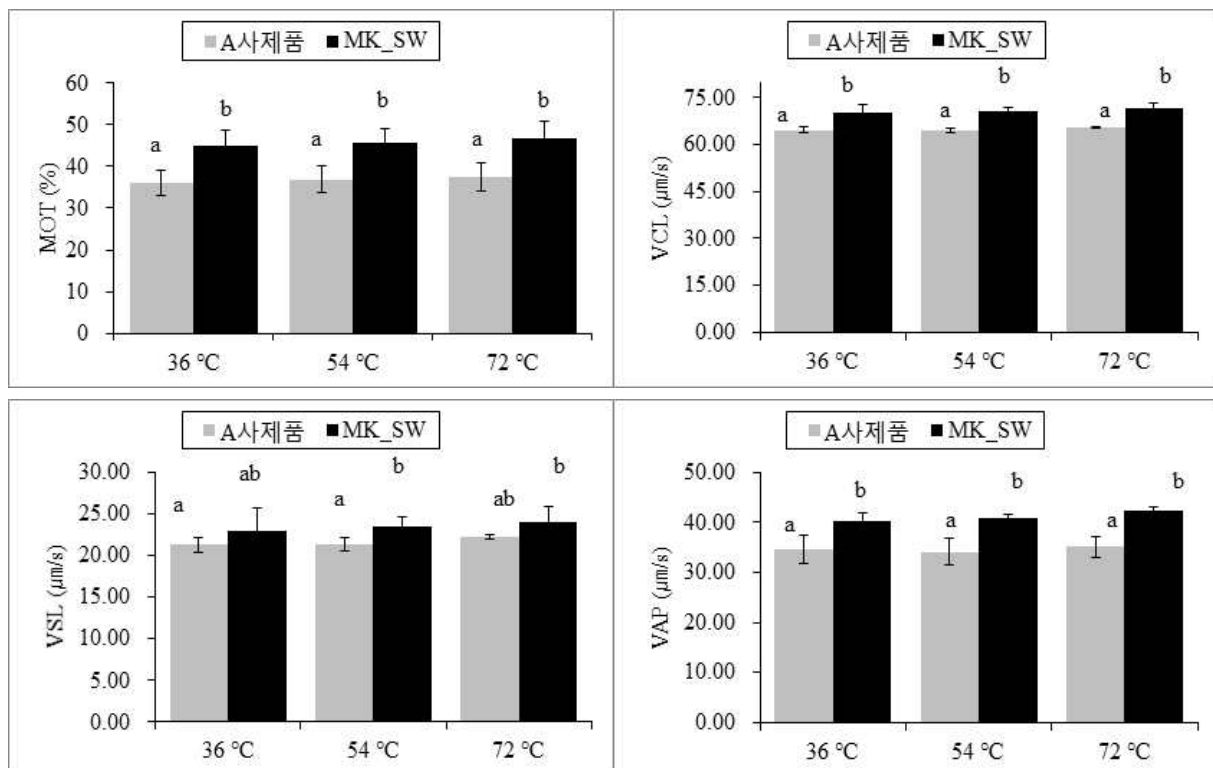
나) 체외 수정 및 동결정액 세척용액 개발

- 체외 수정 배양액은 정액의 운동성 향상, 수정능 획득과 정자가 난자에 침투하는 메커니즘의 연구를 진행하였으며 주로 수정과정에서 이용되고 있는 TALP 배양액을 보완하여 개발하였음. 체외 수정(MK_IVF) 배양액을 기반으로 동결 정액 세척 시 동결용액에 포함된 정자 활동 저해물질들을 제거하고 정액의 운동성을 향상 시킬 수 있는 성분 첨가하여 개발하였음. MK_IVF와 TALP IVF를 성숙 난자를 이용하여 체외 수정율을 비교실험을 진행하였고, MK_IVF가 수정율 81.6%로 TALP IVF 74.5%보다 높았으며, Blastocyst의 발달도 함께 향상되었음

〈표 4〉 MK와 TALP IVF 수정율 및 발달률

	No. of oocyte	No. of embryo (%)				
		Cleavage	4-8cell	8cell<	Morular	Blastocyst
MK IVF	453	370 (81.6%)	345 (75.2%)	298 (65.8%)	257 (56.7%)	174 (38.4%)
TALP IVF	470	350 (74.5%)	331 (70.4%)	289 (61.5%)	344 (51.9%)	158 (33.6%)

- 동결정액 세척용액(MK_SW)의 경우 A사의 제품과의 비교실험을 실시하였음. 실험방법의 경우 동결정액을 해동 이후 A사 제품과 MK_SW에 넣고 온도 별 활력(MOT) 및 곡선운동 속도(VCL), 직선운동속도(VSL), 평균이동속도(VAP)를 판별하였음.
- MOT의 경우 A사제품 대비 MK_SW가 36℃에서 9% 높게 측정 되었고, VCL의 경우 A사 제품 대비 MK_SW가 36℃에서 5.5% 높게 측정되었음
- VSL의 경우 A사제품 대비 MK_SW가 54℃에서 2.1% 높게 측정 되었고, VCL의 경우 A사 제품 대비 MK_SW가 36℃에서 5.7% 높게 측정되었음
- MK_SW가 동결정액 해동이후 활력 및 운동성에서 유의차 있는 높은 결과를 얻었음



〈그림 8〉 MK_SW와 A사 제품 정액성능 비교

다) 수정란 배양 용액 개발

- 수정이 완료된 수정란은 분열을 시작하여 착산 전까지 체외 배양을 시키며, 2cell부터 최종적으로 Blastocyst(배반포)까지 배양이 되어 수정란 이식 및 동결/저온 보존이 진행 됨. 수정란이 발달이 진행되는 단계별로 필요로 하는 영양성분 및 성장인자, 호르몬등이 변화되며 Blastocyst에 가까워질수록 더욱더 많은 성분들이 요구됨. 따라서 발달 단계를 2단계로 나누어 단계별 요구되는 성분들을 연구하여 체외 배양액(MK_IVC)을 개발하였음
- 수정란의 발달율을 비교해 보면 MK_IVC 41.5%, A사 배양액이 38.5%, I사 배양액이 37.5%로 MK 배양액으로 통해서 체외성숙 진행하였을 때 가장 성숙 난자의 비율이 높게 나타났음

〈표 5〉 IVC 제품별 발달률

	No. of oocyte	No. of embryo (%)				
		2cell	4-8cell	8cell<	Morular	Blastocyst
MK IVC	1347	1092 (81.1%)	1025 (76.1%)	905 (67.2%)	850 (63.1%)	559 (41.5%)
A사 IVC	1641	1289 (78.5%)	1223 (74.5%)	1083 (66.0%)	839 (54.4%)	632 (38.5%)
I사 IVC	1320	1103 (77.7%)	1078 (75.9%)	897 (63.2%)	769 (54.1%)	532 (37.5%)

라) 체외 성숙 및 배양 배양액의 개선

- 수정란의 생산 후 보존을 위해 동결 및 저온보존이 기술을 이용하게 되는데 동결/저온 과정을 거친 수정란의 생존성을 향상시키기 위해 지질함량을 줄이는 연구를 진행하였음. 수정란의 지질 함량과 동결/저온 후 생존성의 명확한 대사 관계는 밝혀지지 않았으나, 수정란 내 지질 함량이 많은 경우 동결/저온 후 생존성이 감소하는 경향을 나타내었음. 체외 배양 시 혈청과 BSA를 첨가하는 것이 수정란의 발달을 향상시켜주는 하지만 수정란 내 지질 함량을 증가시켜 동결-해동 후 생존성이 감소되는 것을 볼 수 있었음. 항산화제로 사용되지만 지방산을 미토콘드리아 내부로 이동시키는데 관여해 지질 대사를 조절하는 기능을 하는 L-carnitine을 이용하여 수정란의 생존성 향상 연구를 진행 하였음
- 따라서 혈청과 BSA가 첨가되지 않은 MK 배양액을 이용하여 지질 대사를 촉진해주는 L-carnitine을 첨가하여 수정란을 배양할 경우 수정란의 발달, 지질 함량, 세포사멸 그리고 동결-해동 후 생존성에 미치는 영향에 대해 알아보았음
- 체외 성숙 배지에 L-carnitine을 0mM, 1.5mM, 3.0mM, 6.0mM을 첨가하여 수정란을 배양 하였을 때, 3.0mM에서 93.07%로 분할율과 8세포~상실배 비율이 높았으나, 배반포 형성 율에서는 모든 군에서 유의적인 차이를 보이지 않았음

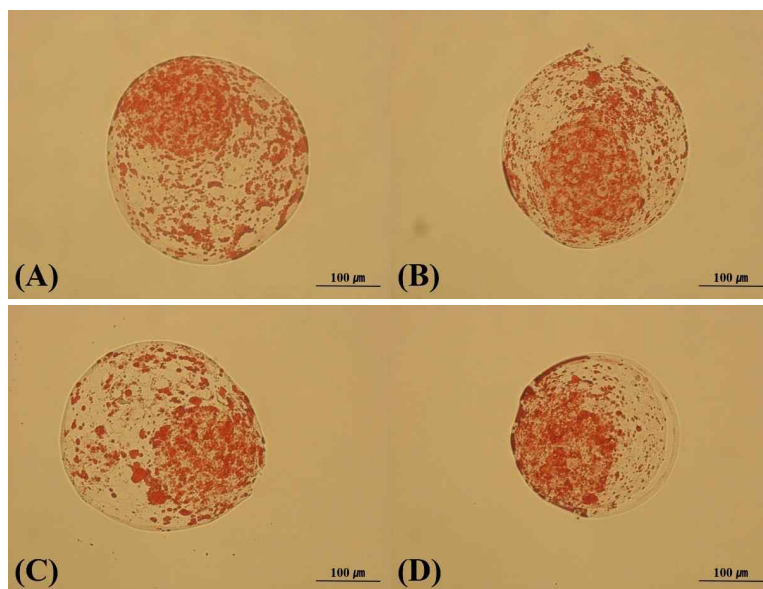
〈표 6〉 MK_IVM 배양액에 L-carnitine을 농도별로 첨가 후 발달률

L-carnitine concentration (mM)	No. of oocytes	No. of embryo (mean ± SEM, %) ND				
		Cleavage	4-8cell	8cell<	Morula	Blastocyst
Control	209	189 (90.43 ± 1.58) ^{ab}	186 (89.00 ± 1.69)	174 (83.25 ± 1.78) ^{ab}	147 (70.33 ± 1.34) ^a	80 (38.28 ± 2.47)
1.5	214	198 (92.52 ± 1.19) ^{ab}	195 (91.12 ± 1.51)	179 (83.64 ± 3.34) ^{ab}	152 (71.03 ± 3.32) ^a	93 (43.46 ± 5.19)
3.0	202	188 (93.07 ± 1.78) ^a	185 (91.58 ± 1.88)	178 (88.12 ± 2.72) ^a	147 (72.77 ± 3.36) ^a	96 (47.52 ± 9.57)
6.0	202	178 (88.12 ± 1.73) ^b	176 (87.13 ± 2.16)	155 (76.73 ± 2.03) ^b	120 (59.41 ± 4.55) ^b	86 (42.57 ± 4.07)

- 수정란 내의 지질 함량을 측정한 결과 모든 군에서 유의적인 차이를 보이지 않았음

<표 7> MK_IVM 배양액에 L-carnitine을 농도별로 첨가 후 지질 함량 측정

L-carnitine concentration (mM)	Lipid contents/Embryo (mean \pm SEM, %) ND
0	29.54 \pm 2.72
1.5	33.08 \pm 3.19
3.0	25.98 \pm 3.10
6.0	31.54 \pm 3.28

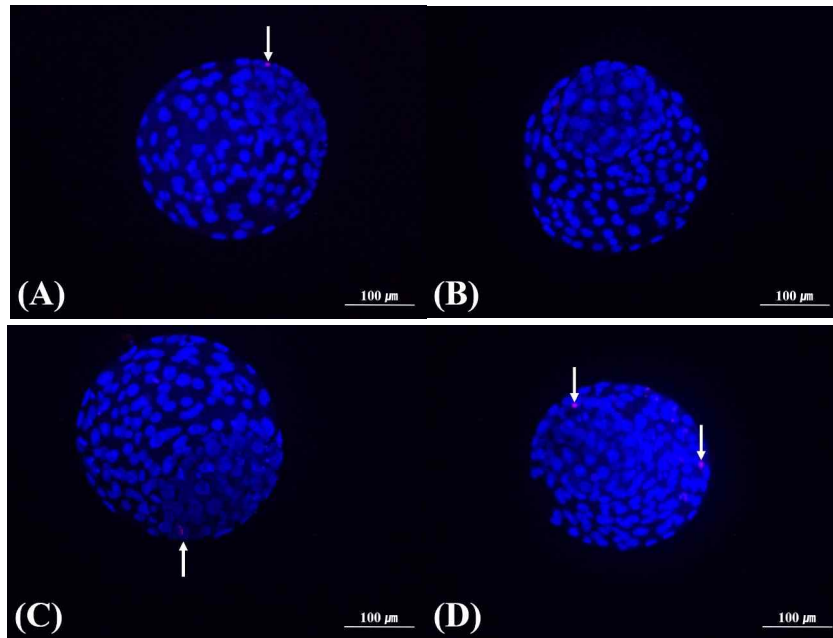


<그림 9> MK_IVM 배양액에 L-carnitine을 농도별로 첨가 후 지질 축적량 0mM (A), 1.5mM (B), 3.0mM (C), 6.0mM (D)

- 체외 성숙 배지에 L-carnitine을 0mM, 1.5mM, 3.0mM, 6.0mM을 첨가하여 배양한 후에 수정란에서 세포사멸 수를 측정하였음. 3.0mM에서 전체 세포 수가 유의적으로 더 많았고, 1.5 mM과 3.0 mM에서 0mM과 6.0 mM 보다 세포사멸률이 더 낮은 것을 확인함

<표 8> MK_IVM 배양액에 L-carnitine을 농도별로 첨가 후 세포 수 및 세포사멸

L-carnitine concentration (mM)	No. of total cell (mean \pm SEM)	Apoptotic cells (mean \pm SEM)	Apoptosis rates (mean \pm SEM, %)
0	183.00 \pm 8.45 ^a	5.50 \pm 1.19 ^a	3.01 \pm 0.66 ^a
1.5	186.70 \pm 9.09 ^{ab}	3.00 \pm 0.63 ^b	1.61 \pm 0.34 ^b
3.0	206.00 \pm 6.39 ^b	3.10 \pm 0.38 ^b	1.50 \pm 0.17 ^b
6.0	179.50 \pm 4.82 ^a	5.50 \pm 0.37 ^a	3.06 \pm 0.25 ^a



<그림 10> MK_IVM 배양액에 L-carnitine을 농도별로 첨가 후 총 세포 수 및 사멸 세포 수 측정. 0mM (A), 1.5mM (B), 3.0mM (C), 6.0mM (D)

- 체외 배양 배지에 L-carnitine을 0 mM, 1.5 mM, 3.0 mM, 6.0 mM을 첨가하여 수정란을 생산하였을 때, 배반포 형성을에서 유의적인 차이를 보이지 않았음

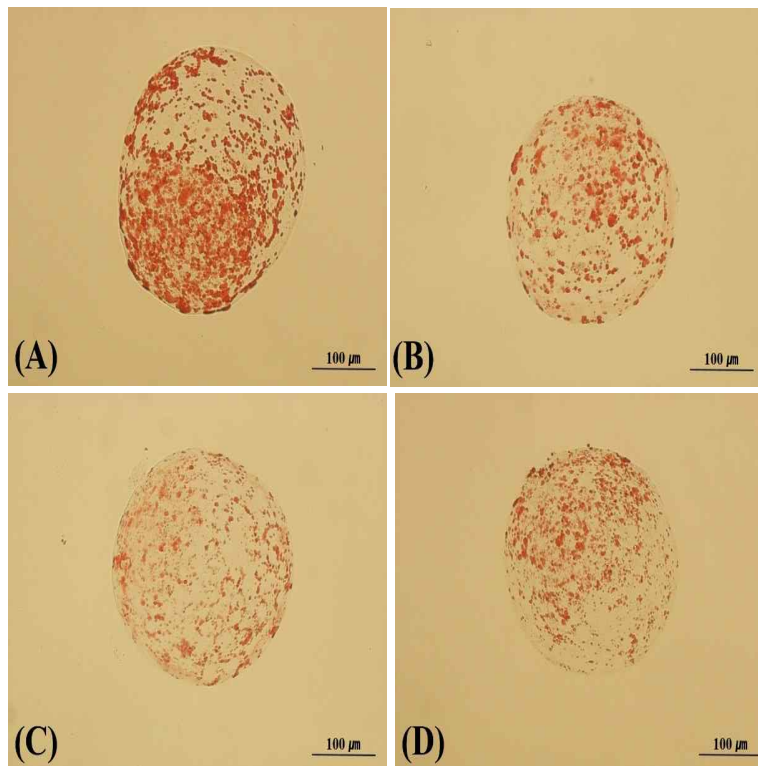
<표 9> MK_IVC 배양액에 L-carnitine을 농도별로 첨가 후 발달률

L-carnitine concentration (mM)	No. of oocytes	No. of embryo (mean ± SEM, %) ND				
		Cleavage	4-8cell	8cell<	Morula	Blastocyst
Control	254	228 (89.76 ± 4.29)	226 (88.98 ± 4.82)	214 (84.25 ± 3.80)	178 (70.08 ± 2.90)	113 (44.49 ± 3.52)
1.5	284	255 (89.79 ± 1.54)	252 (88.73 ± 1.14)	221 (77.82 ± 1.97)	170 (59.86 ± 5.51)	121 (42.61 ± 2.96)
3.0	325	288 (88.62 ± 6.64)	284 (87.38 ± 3.34)	259 (79.69 ± 3.92)	211 (64.92 ± 4.35)	157 (48.31 ± 3.00)
6.0	292	261 (89.38 ± 5.89)	257 (88.01 ± 1.94)	229 (78.42 ± 2.78)	177 (60.62 ± 4.89)	107 (36.64 ± 5.01)

- L-carnitine이 첨가된 1.5 mM, 3.0 mM, 6.0 mM 그룹이 0mM 보다 유의적으로 적은 지질 함량을 보임

<표 10> MK_IVC 배양액에 L-carnitine을 농도별로 첨가 후 지질함량 측정

L-carnitine concentration (mM)	Lipid contents/Embryo (mean \pm SEM, %)
Control	33.11 \pm 1.03 ^a
1.5	17.87 \pm 0.97 ^b
3.0	14.89 \pm 2.22 ^b
6.0	13.80 \pm 1.06 ^b

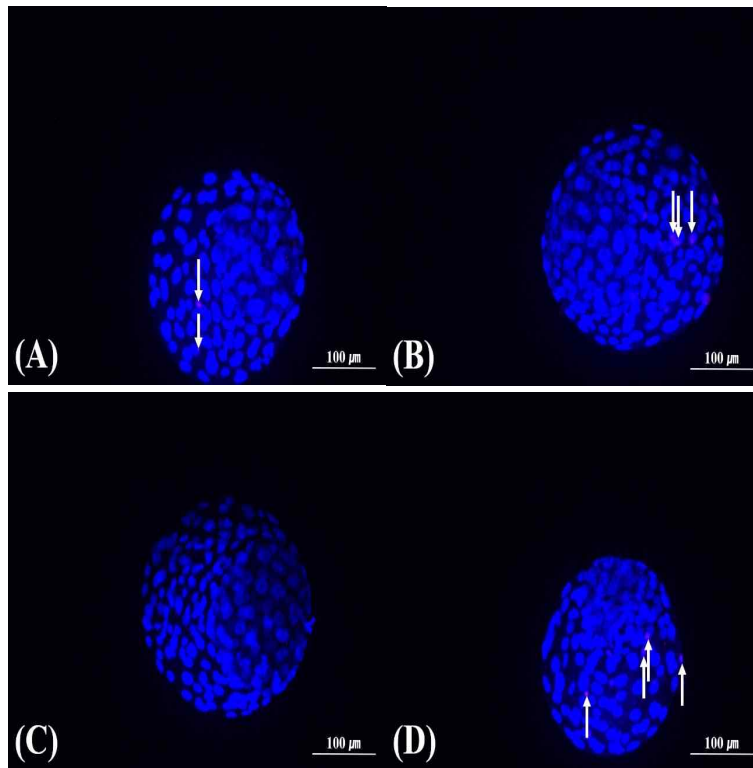


<그림 11> MK_IVC 배양액에 L-carnitine을 농도별로 첨가 후 지질 축적량
0mM (A), 1.5mM (B), 3.0mM (C), 6.0mM (D)

- L-carnitine이 첨가된 1.5 mM, 3.0 mM, 6.0 mM 그룹이 0mM 보다 유의적으로 적은 세포 사멸률을 보이고, 총 세포 수는 유의적인 차이를 보이지 않았음

<표 11> MK_IVC 배양액에 L-carnitine을 농도별로 첨가 후 세포 수 및 세포사멸

L-carnitine concentration (mM)	No. of total cell (mean \pm SEM) ND	Apoptotic cells (mean \pm SEM)	Apoptosis rates (mean \pm SEM, %)
Control	188.30 \pm 11.24	6.30 \pm 0.90 ^a	3.35 \pm 0.59 ^a
1.5	188.70 \pm 14.51	3.70 \pm 0.60 ^b	1.96 \pm 0.37 ^b
3.0	215.20 \pm 7.66	1.90 \pm 0.46 ^b	0.88 \pm 0.24 ^b
6.0	181.40 \pm 12.92	3.90 \pm 1.25 ^{ab}	2.15 \pm 0.59 ^b



<그림 12> MK_IVC 배양액에 L-carnitine을 농도별로 첨가 후 총 세포 수 및 사멸 세포 수 측정. 0mM (A), 1.5mM (B), 3.0mM (C), 6.0mM (D)

- L-carnitine을 체외 성숙 배지에 0mM, 1.5 mM, 3.0 mM, 6.0 mM을 첨가하고 체외 배양 배지에 3.0 mM 씩 첨가하였을 때 배반포 형성율에서 유의적인 차이를 보이지 않음

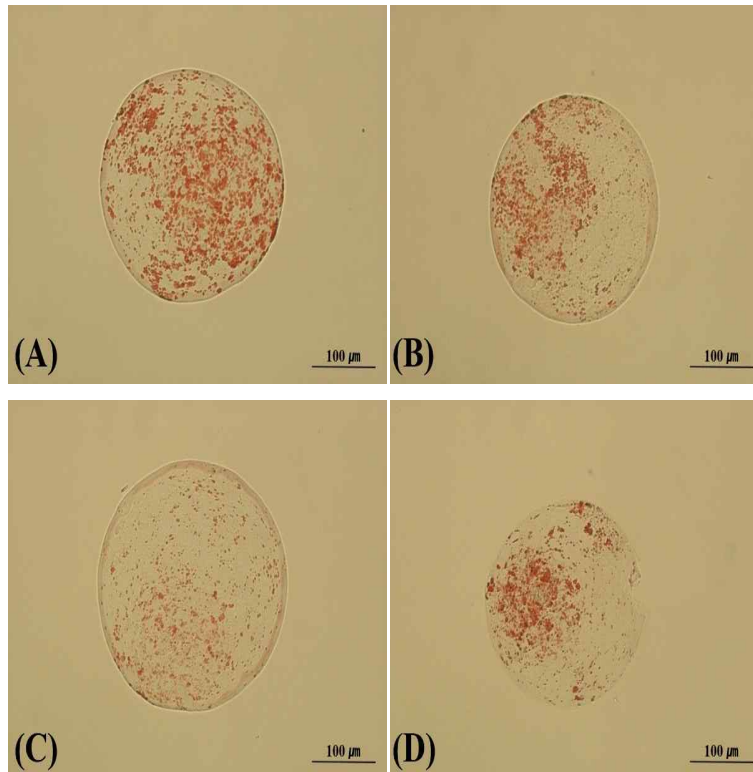
<표 12> MK_IVM과 MK_IVC 배양액에 L-carnitine을 첨가 후 발달률

L-carnitine concentration (mM)	No. of oocytes	No. of embryo (mean ± SEM, %) ND				
		Cleavage	4-8cell	8cell<	Morula	Blastocyst
0.0 - 3.0	268	237 (88.43 ± 1.85)	236 (88.06 ± 1.95)	214 (79.85 ± 3.05)	171 (63.81 ± 2.34)	102 (38.06 ± 2.31)
1.5 - 3.0	276	238 (86.23 ± 6.20)	233 (84.42 ± 6.19)	210 (76.09 ± 6.07)	179 (64.86 ± 5.63)	117 (42.39 ± 5.15)
3.0 - 3.0	258	232 (89.92 ± 2.24)	230 (89.15 ± 2.07)	218 (84.50 ± 3.62)	187 (72.48 ± 5.65)	122 (47.29 ± 4.41)
6.0 - 3.0	279	253 (90.68 ± 2.36)	247 (88.53 ± 2.25)	227 (81.36 ± 2.57)	190 (68.10 ± 2.59)	115 (41.22 ± 3.90)

- 체외 성숙 배지와 체외 배양 배지에 3.0 mM의 L-carnitine을 각각 첨가하였을 때 다른 군 보다 유의적으로 적은 지질 함량을 보임

〈표 13〉 MK_IVM과 MK_IVC 배양액에 L-carnitine 첨가 후 지질함량 측정

L-carnitine concentration (mM)	Lipid contents/Embryo (mean ± SEM, %)
0.0 - 3.0	14.61 ± 1.47 ^a
1.5 - 3.0	12.89 ± 1.01 ^a
3.0 - 3.0	8.24 ± 1.67 ^b
6.0 - 3.0	12.71 ± 1.11 ^a

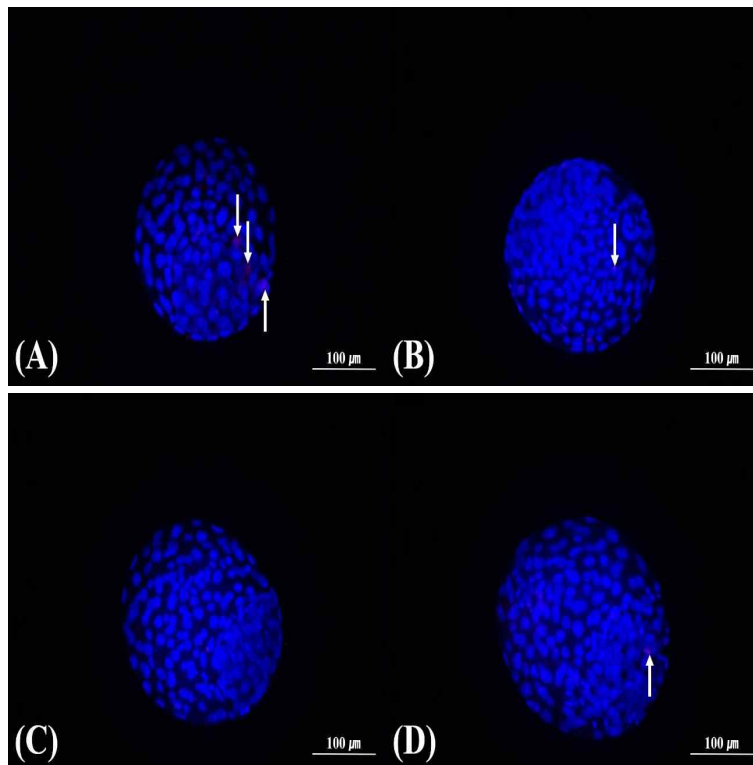


〈그림 13〉 MK_IVM과 MK_IVC 배양액에 L-carnitine 첨가 후 지질 축적량
MK_IVM 0mM (A), 1.5mM (B), 3.0mM (C), 6.0mM (D) 첨가 후 MK_IVC
3.0mM 첨가

- 총 세포 수에서는 모든 그룹에서 유의적인 차이를 보이지 않았고, 체외 성숙 배지에 1.5 mM 혹은 3.0 mM의 L-carnitine을 첨가하고 체외 배양 배지에 3.0 mM의 L-carnitine을 첨가하였을 때 체외 성숙 배지에 L-carnitine을 첨가하지 않은 군보다 유의적으로 적은 세포사멸률을 보임. 또한 체외 성숙 배지와 체외 배양 배지에 L-carnitine을 3.0 mM 씩 첨가하였을 때 6.0 mM과 3.0 mM 씩 첨가한 군보다 유의적으로 적은 세포사멸률을 보임

<표 14> MK_IVM과 MK_IVC 배양액에 L-carnitine 첨가 후 세포 수 및 세포사멸

L-carnitine concentration (mM)	No. of total cell (mean \pm SEM) ND	Apoptotic cells (mean \pm SEM)	Apoptosis rates (mean \pm SEM, %)
0.0 - 3.0	204.50 \pm 7.20	5.60 \pm 0.97 ^a	2.74 \pm 0.50 ^a
1.5 - 3.0	222.80 \pm 7.07	3.10 \pm 0.57 ^{bc}	1.39 \pm 0.22 ^{bc}
3.0 - 3.0	220.50 \pm 4.13	2.30 \pm 0.42 ^c	1.04 \pm 0.20 ^c
6.0 - 3.0	211.70 \pm 8.05	4.60 \pm 0.52 ^{ab}	2.17 \pm 0.26 ^{ab}



<그림 14> MK_IVM과 MK_IVC 배양액에 L-carnitine 첨가 후 총 세포 수 및 사멸 세포 수 측정. MK_IVM 0mM (A), 1.5mM (B), 3.0mM (C), 6.0mM (D) 첨가 후 MK_IVC 3.0mM 첨가

- 체외 성숙 배지와 체외 배양 배지에 L-carnitine을 전혀 첨가하지 않은 그룹과 3.0 mM 씩 첨가한 그룹에서 생산한 7일차의 확장배반포와 배반포를 동결하였음. 확장배반포를 동결-해동하였을 때는 생존률과 해칭률에 유의적인 차이를 보이지 않았지만 배반포를 동결-해동하였을 때 L-carnitine을 첨가한 군에서 대조군보다 유의적으로 높은 해칭률을 보임

〈표 12〉 L-carnitine 첨가한 확장 배반포의 동결-해동 후 생존율

L-carnitine treatment	No. of blastocysts	No. of viable embryos (mean ± SEM, %) ND	No. of hatched embryos (mean ± SEM, %) ND
Control	84	79 (94.05 ± 2.35)	74 (88.10 ± 3.58)
Treatment	77	73 (94.81 ± 2.35)	64 (83.12 ± 6.28)

〈표 13〉 L-carnitine 첨가한 배반포의 동결-해동 후 생존율

L-carnitine treatment	No. of blastocysts	No. of viable embryos (mean ± SEM, %) ND	No. of hatched embryos (mean ± SEM, %)
Control	122	91 (74.59 ± 5.13)	74 (60.66 ± 6.91) ^a
Treatment	121	110 (90.91 ± 2.09)	97 (80.17 ± 3.39) ^b

- 체외 성숙 배지에 L-carnitine을 첨가하는 것은 총 세포 수를 증가시키고 체외 배양 배지에 L-carnitine을 첨가하는 것이 지질 함량을 감소시킴. 또한 체외 성숙 배지나 체외 배양 배지에 L-carnitine을 첨가하는 것이 세포사멸률을 감소에 영향을 줌. 체외 성숙 배지와 체외 배양 배지에 L-carnitine을 첨가하여 생산한 배반포를 동결-해동하였을 때 생존율을 향상시킴

마) 저온 보존 용액의 개발

- 체외 수정란의 이식 효율 향상을 위해 복잡한 단계의 장기보관용 동결이 아닌 이식 적기에 맞출 수 있는 단기간 저장이 가능한 저온 보존 용액을 개발 하고자 함. 수정란을 이용하여 저온 보존이 가능한 용액을 개발하고 수정란 단계에 따른 저온 보존 후 생존성 확인하였고, 저온 보존의 효율을 높이기 위해 저온 보존 용액에 FBS와 BSA를 첨가하여 저온보존 후 배발달과 세포사멸을 측정하였음
- 한우 수정란의 배반포 단계에서 저온보존을 실시하여 생존율과 재 발달율을 평가하였을 때 보존기간이 길어질수록 생존율이 저하되는 것으로 나타났으며(6일차 57.6±11.3%, 7일차 66.9±9.8%), 재 발달율에서도 6일차(41.4±16.0%)와 7일차(31.8±14.2%)에서 가장 유의적으로 낮게 나타남

〈표 14〉 4℃ 저온보존 시간에 따른 배반포 생존율

Storage time (Day)	No. of blastocysts	No. of viable embryos (%)	No. of hatching embryos (%)
24 h (D1)	35	35 (100 ± 0) ^a	34 (97.9 ± 2.1) ^a
48 h (D2)	35	33 (94.9 ± 2.7) ^a	32 (92.8 ± 3.7) ^a
72 h (D3)	37	35 (94.6 ± 2.7) ^a	32 (85.8 ± 6.5) ^a
96 h (D4)	34	29 (84.4 ± 7.2) ^{ab}	27 (78.3 ± 9.4) ^a
120 h (D5)	34	28 (83.2 ± 8.4) ^{ab}	24 (71.0 ± 4.8) ^a
144 h (D6)	34	18 (57.6 ± 11.3) ^c	13 (41.4 ± 16.0) ^b
168 h (D7)	31	19 (66.3 ± 9.8) ^{bc}	8 (31.8 ± 14.2) ^b

- 저온보존 미디어에 FBS를 대조군으로 사용하고, BSA를 농도별로 첨가하여 생존율과 재 발달율을 평가한 결과, 생존율에서는 모든 실험군에서 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았음. 그러나 재 발달율에서는 대조군인 FBS(66.9±1.6%)와 BSA 1%(63.7±1.9%) 실험군에서만 유의적인 차이를 보이지 않았고, 다른 농도의 BSA 첨가(0.3%, 0.5%, 3%, 5%, 평균 44.8±13.7%) 실험군에서는 유의적으로 낮게 나타남

〈표 15〉 BSA 농도에 따른 저온보존 용액에 4℃ 72시간 후 배반포 생존율

Concentrations of BSA	No. of blastocysts	No. of viable embryos (%)	No. of hatching embryos (%)
Control (FBS)	36	29 (83.4 ± 4.1)	23 (66.9 ± 1.6) ^a
0.3%	39	26 (67.9 ± 6.6)	14 (32.6 ± 3.8) ^b
0.5%	38	31 (79.5 ± 10)	13 (34.8 ± 10.6) ^b
1%	33	27 (81.2 ± 2.4)	21 (63.7 ± 1.9) ^a
3%	34	24 (69.6 ± 15)	16 (31.7 ± 9.3) ^b
5%	37	30 (80.0 ± 11.5)	20 (54.4 ± 4.4) ^{ab}

- TUNEL을 통한 총 세포수 측정에서는 각 그룹간의 유의적인 차이를 나타내지 않았고, 세포사멸 비율을 비교하였을 때 대조군($4.08 \pm 0.93\%$)에 비해 FBS($8.07 \pm 1.62\%$)와 BSA($8.45 \pm 2.48\%$) 모두에서 유의적으로 높게 나타남

<표 16> 저온 보존 용액에 FBS와 BSA 첨가 후 세포수와 세포사멸 측정

Groups	No. of Blastosysts	No. of total cells (mean \pm SEM)	No. of apoptotic cells (mean \pm SEM)	% of apoptotic cells (mean \pm SEM)
Control	7	200 \pm 19.21	8.14 \pm 1.86 ^a	4.08 \pm 0.93 ^a
FBS	7	204.86 \pm 32.07	16.57 \pm 4.39 ^b	8.07 \pm 1.62 ^b
BSA	7	198.14 \pm 15.46	16.86 \pm 5.42 ^b	8.45 \pm 2.48 ^b

- 배반포를 저온보존 하였을 때 보존 5일째까지 생존율과 재 발달율에서 유의적인 차이를 보이지 않았음을 확인하였고, 저온보존 배지에 BSA 1%를 사용하였을 때 생존율과 재 발달율에서 FBS 첨가 배지와 유의적인 차이를 보이지 않았음. BSA 1% 첨가 저온보존액은 생존성과 품질 모두에서 이식 수정란으로 사용하기에 적합하여 BSA가 FBS와 대체하여 사용 할 수 있는 것을 확인함. 그러나 아직까지 저온 보존 시스템이 안정화 되어있지 않았고, 저온 보존 전 후의 배반포의 변화를 최소화하기 위해 더 많은 연구가 요구됨

다. 제품 사양

- MK 배양액 6종 제품화 완료

제품 사진	제품 명칭	용도	용량
	MK_WM	난자 세척용	500ml (500ml*1ea)
	MK_OPU	OPU 난자 채취용	500ml (500ml*1ea)
	MK_IVM	체외 성숙용	100ml (50ml*2ea)
	MK_SW	동결정액 세척용	200ml (100ml*2ea)
	MK_IVF	체외 수정용	100ml (50ml*2ea)
	MK_IVC (C-1/C-2)	체외 수정란 배양용 (초기/후기)	100ml (50ml*2ea)

라. 제품 우월성

제품	제조사	용량	금액/10ml(천원)	비고
WM	MK	500ml	2.2	
	A사	40ml	71.3	
	I사	50ml	11	
OPU	MK	500ml	2.2	
	A사	-	-	
	I사	500ml	1.5	
IVM	MK	100ml	50	
	A사	40ml	71.3	
	I사	10ml	55	
SW	MK	200ml	12.5	
	A사	360ml	23.7	4step
	I사	20ml	22	
IVF	MK	100ml	15	
	A사	60ml	23.7	
	I사	10ml	55	
IVC	MK	100ml	100	2step
	A사	80ml	142.6	2step
	I사	10ml	110	

- 유통기한 이내 효율적으로 이용 할 수 있는 정량 포장
- 수입 제품과 비교 시 가격경쟁력 확보
- 국내 수입제품 이용 시 장기배송시간으로 사용기간의 감소와 고가의 제품으로 사용하는 데 불편함이 있었으나, 본 사업을 통해 개발된 배양액 6종은 자체 생산으로 생산비 감소와 본사에서 보유하는 수정란 생산 시스템에 바로 적용하여 품질 검증이 완료된 제품의 신속한 배송이 가능함.

마. 경제적 성과

1) 제품개발을 통한 생산성 향상 및 산업기여도

- MK 배양액의 개발을 통한 체외 배양 기술 개선으로 난자 수 대비 수정란 생산 효율이 향상 되었으며 수정란 이식의 증가로 연계되어 수정란 이식 산업의 성장 속도 향상을 기대 할 수 있음.
- 고능력 공란우의 활용이 증가됨에 따라 한우의 개량을 촉진시키고 이는 축산 농가에 수정란 이식을 통한 소득 증대뿐만 아니라 국가 축산업 발전에 기여함.

2) 시장점유율

- 국내 각 도 축산관련 연구소 외 농촌진흥청 축산과학원, 수정란 생산 관련 연구시설 다수의 거래처 보유하고 있으며 국내 한우 수정란 배양액 시장의 80% 확보

3) 매출액 증대

- 수정란 생산 연구시설에 MK 배양액의 판매 개척 및 MK 배양액을 통한 수정란 생산량의 증가로 수정란 이식 사업 증가
- 배양액 매출액은 2018년도(1차) 84,458천원, 2019년도(2차) 117,563천원의 매출액을 달성 하였으며 전년도 대비 36% 매출 증대를 보임.

4) 고용창출

- 2018년 5명의 신규 인력 고용
- 2019년 1명의 신규 인력 고용
- 2020년 1명의 신규 인력 고용으로 7명 상시근로자 근무
- 2020년 1명의 신규 인력 고용 예정

바. 사업화 성과

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	2억원
			향후 3년간 매출	3.5억원
		관련제품	개발후 현재까지	3.5억원
			향후 3년간 매출	6.5억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 80% 국외 : %
			향후 3년간 매출	국내 : 90% 국외 : %
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 30% 국외 : %
			향후 3년간 매출	국내 : 40% 국외 : %
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		6 위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		4 위

라. 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	2018. 04. 31 ~ 2019. 12. 31(2년)			
	소요예산(백만원)	234			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		2	3.5	4	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	80%	90%	90%
국외		-	-	-	
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	체외생산 기술 향상을 위한 전용 용기 개발계획			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	2	3.5	4	
	수 출	-	-	-	

3장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

1. 연도별 연구목표

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도	2018	난자 세척용 배지 개발 실험	- 도축 유래 난소에서 난자를 획득, 이후 세척과정과 성숙과정을 거쳐 성숙을 확인 - 도축장유래 난소에서 주사기를 통해 얻어진 난자의 세척에 사용하는 배지 개발 - 일반적으로 단계별 세척에 사용가능
		OPU 세척용 배지 개발 실험	- OPU를 실시 살아있는 소에서 난자를 획득, 이후 세척과정과 성숙과정을 거쳐 성숙을 확인 - OPU 방법을 이용하여 살아 있는 소의 난소에서 얻어진 난자의 세척에 사용하는 배지 개발 - 난소의 획득 과정에서 얻어지는 혈액의 응고를 막기 위한 시약을 사용하여 개발
		체외성숙용 배지 개발 실험	- 세척된 미성숙 난소의 성숙에 사용되는 배지 개발 실험 - 체외성숙에 필요한 호르몬 첨가 - 미성숙 난자의 성숙에 필요한 체외 성숙 배지의 개발 - CO2 배양기를 이용하여 체외에서 22시간 성숙을 시킴
2차년도	2019	동결정액 세척용 배지 개발 실험	- 해동 후 정자의 운동성 및 직진성, 활력등 평가 - 체외수정 시 동결 정액의 세척에 사용되는 배지의 개발 - 정자의 활력이나 생존성에 영향을 미치지 않는 배지의 개발
		난자 및 정자 수정용 배지 개발 실험	- 정자의 수정능획득 및 수정율을 평가 - 성숙된 난자와 세척이 완료된 정자의 수정에 사용되는 배지의 개발 - 수정능력 획득에 필요한 시약을 사용하여 배지 개발
		수정란 배양용 배지 2종 개발 실험	- 수정을 마친 수정란의 배양에 사용되는 배지 개발 실험 - 수정란 발달 단계에 따라 2단계에 걸친 배양 배지 개발 실험 - 수정란 생산을 평가
		수정란 이식용 배지 개발 실험	- 수정란의 세포 분화를 억제하여 수정란의 생존성을 증가 - 저온 보존 기술을 이용하여 수정란 생존시간 증가 - 수정란의 생존 시간 증가에 따른 활용도 증가

2. 계획대비 달성도

구분	연구개발의 목표	달성내용	달성도(%)
1차년도 (2018)	난자 세척용 배지 개발 실험	- 도축난소를 이용하여 난소당 난자 회수율 파악: 1개당 평균 28개 난자 회수	100
		- 난소의 세척 후 생존율 파악: 82.7% 생존	
		- 난자 성숙 이후 분할율 파악: 80.2% 분할 달성	
	OPU 세척용 배지 개발 실험	- OPU기술을 이용하여 난소당 난자 회수율 파악: 1개당 평균 15.8개 난자 회수	100
		- 난소의 세척 후 생존율 파악 : 85.6% 생존	
		- 난자 성숙 이후 분할율 파악 : 83.4% 분할 달성	
체외성숙용 배지 개발 실험	- 경쟁사 제품비교실험 실시	100	
	- 22시간 이후 극체를 이용한 체외성숙 판단 : 자사 81.4% 달성		
	- 수정이후 수정란 생성을 판단 : 41.0% 달성		
2차년도 (2019)	난자 및 정자 수정용 배지 개발 실험	- 체외수정을 판단 : 81.6% 달성	100
		- 수정란 생성을 판단 : 38.4% 달성	
	동결정액 세척용 배지 개발 실험	- 정액 활력도 평가 : 타사대비 9% 높게 측정	100
		- 정액 운동성 평가 : 타사대비 5.5% 높게 측정	
	수정란 배양용 배지 2종 개발 실험	-체외수정을 판단 : 81.1% 달성	100
		- 수정란 생성을 판단 41.5%	
	수정란 이식용 배지 개발 실험	- 저온보존에 따른 시간별 생존율 판단 : 24h 이후 97.9% 생존율 달성	100
		- BSA와 FBS 비교를 통한 생존율 판단 : BSA 1%가 72h 이후 생존율 81.2% 달성	

3-3. 목표 미달성 시 원인 및 차후대책

해당사항 없음

4장. 연구결과의 활용 계획 등

1. 연구 성과의 활용분야 및 활용방안

- 수정란 이식 효율 향상을 통한 고능력 공란우의 활용 범위를 확대
- 희귀 유전자원 번식 효율 향상 및 보존에 활용가능
- 특정 품종, 계통의 확대 생산
- 수정란의 장거리 이송 가능
- 전반적인 포유동물의 수정란 이식 연구에 활용 가능

2. 기대성과 및 파급효과

가) 체외 배양 기술 개선을 통한 수정란 생산을 개선

- 체외 배양약을 개선하여 회수 난자 수 대비 수정란 생산효율을 향상
- 수정란 생산량 증가로 인한 고능력 공란우 활용성 증대
- 희귀 유전자원의 보존 및 증진에 활용 가능
- 수정란 생산비 감소
- 농가에 이식을 통한 개량 및 소득 증대 기여

나) 수태율 향상을 위한 수란우 맞춤 수정란 이식기술 개발

- 수정란의 저온보존 기술 개발을 통하여 수정란의 생존기간을 약 72시간 까지 증가시킴으로서 신선수정란의 활용성을 높임
- 수정란 생존일 증가로 인한 다양한 발정일의 수란우에 신선수정란을 공급할 수 있음
- 수란우 발정상태 맞춤 수정란 공급으로 수태율 향상을 기대할 수 있음
- 수태율 및 임신율 증가로 농가의 공태율을 줄일 수 있음
- 농가의 공태 일수에 감소에 따른 경제적 부담 감소

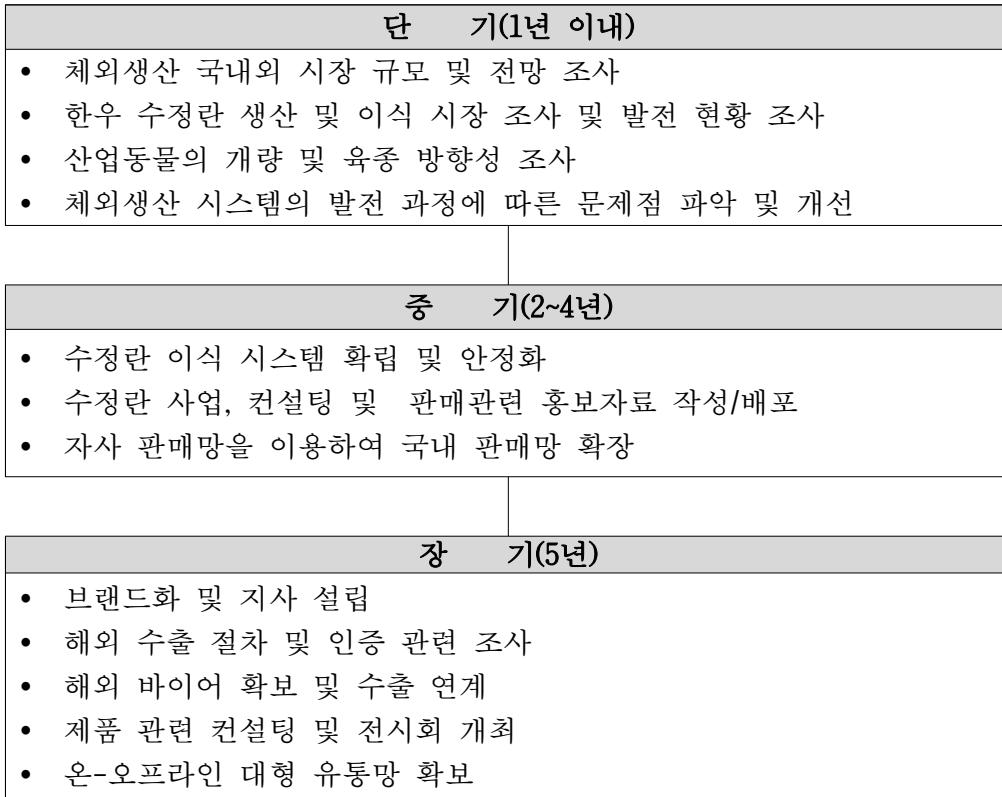
3. 추가 연구 필요성

- 연구개발의 목적에서와 같이 한우의 경쟁력을 확보하기 위해서는 고능력 공란우의 활용성을 극대화 시켜 정자와 난자의 활용을 통해 유전능력을 끌어 올리는 것이 필요함. 하지만 수정란 배양액의 수입으로 인해 수정란 생산비용이 올라가고 낮은 수정란 배양률과 수태율은 아직 풀어야 할 과제로 남아 있음
- 체외수정란 생산 기술은 축산업뿐만 아니라 포유동물 전반에 응용될 수 있음. 즉 포유동물 연구를 진행하는 연구기관이나 사람의 불임을 치료하는 클리닉에도 기술 적용이 가능함. 수정란 생산 기술을 통해 축산분야는 물론이고 나아가 사람의 불임으로 인해 고통 받는 환자들을 도울 수 있을 것으로 기대됨
- 전 세계적으로 자국의 유전자원에 대한 보호노력을 기울이고 있는 상황임. 동결 보존 기술을 이용하여 유전자원의 확보 및 영구적 보존을 통해 우리나라 유전자원을 지켜나가야 할 필요가 있음
- 제품 자체의 경쟁력을 높이기 위한 추가적인 제품개발 연구와 특허 확보에 대한 연구가 필요함

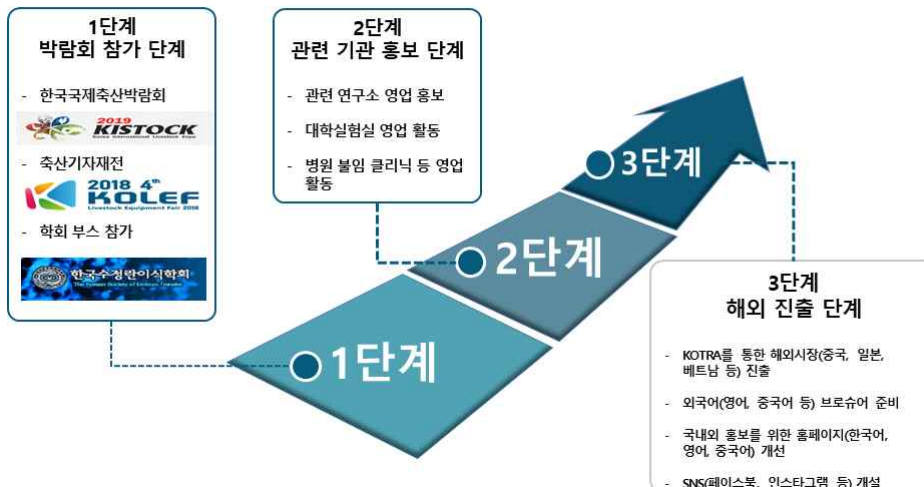
4. 타 연구에의 응용

- 본 연구에서 한우의 수정란 이식배지 연구를 통해 포유동물 전반에 응용될 수 있음
- 특히 반추동물들은 비슷한 경향을 보이는 것으로 나타남
- 이를 통해 다른 반추동물의 수정란생산연구에 응용이 될 것으로 기대됨
- 더 나아가 사람의 수정란생산연구에 응용되어 불임연구에 응용될 수 있을 것으로 기대됨

5. 기업화 추진방안



신규 시장 확장 및 해외 시장 진출



<뒷면지>

주 의

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

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 한우 수정란 배양액 및 이식배지 개발을 통한 수태율 향상 연구				
	(영문) Improvement of pregnancy rate by development of in vitro culture and embryo transfer media in Hanwoo				
주 관 연구 기관	(주)엠케이바이오텍		주 관 연 구 자	(소속) (주)엠케이바이오텍	
참 여 기 업	충남대학교 산업협력단		책 임 자	(성명) 박 연 배	
총 연구개발비 (234,000천원)	계	234,000천원	총 연 구 기 간	2018. 04. 31. ~ 2019. 12. 31.	
	정부출연 연구개발비	175,000천원	총 참 여 수	총 인 원	14
	기업부담금	59,000천원		내부인원	14
	연구기관부담금			외부인원	
<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <p>체외 배양 기술 개선을 통하여 유전능력이 우수한 고능력 공란우를 활용성을 극대화 시키고, OPU 기술을 이용 생체 내 난자를 채취하여 우수한 수정란을 장기보존 기술 개발을 통한 수란우 맞춤형 수정란 이식체계를 확립하여 고능력 송아지 생산율을 높임으로써 우량 유전자원을 확보, 보존 및 유지 시키고, 나아가 고급육 생산 체계를 갖추어 한우 사육농가의 소득 증대와 수입육에 대한 차별화된 한우의 경쟁력을 확보하기 위한 모델과 기술을 개발하고자 한다.</p> <p>○ 연구내용 및 결과</p> <p>1차년도에 난자세척 배지 개발, OPU 체란 배지 개발, 난자 체외성숙 배지를 연구하여 실험을 하였다. 그 결과 체외 배양액의 국산화를 하였으면 제품화 하여 판매까지 하였다.</p> <p>2차년도에는 1차년도에 개발된 3종의 배양액에 이어 동결정액 세척용 배지 개발, 난자 및 정액 수정용 배지 개발, 체외배양 배지 2종 개발, 수정란 이식용 배지를 연구하여 실험하였다. 그 결과 총 7종의 배양액을 연구하여 수정란 생산 배양액을 국산화 하여 각 축산연구소에 제품을 판매하였다.</p> <p>각 개발된 배양액은 국내에서 주로 이용되는 수입 배양액과의 비교실험을 진행 하였으며 그 효율이 입증돼 제품화 하여 판매에까지 이뤄지게 되었다.</p> <p>○ 연구성과 활용실적 및 계획</p> <p>현재 한우의 유전적 개량은 주로 정액위주의 개량이 이루어지고 있는데 암소의 능력까지 활용할 수 있는 수정란 이식을 통하여 한우 개량속도를 더 효율적으로 개선한다. 또 수정란 배양액은 국내 판매는 물론 중국, 베트남 등 주변국 들에 판매하여 해외시장의 판로를 확보하고 활성화 시키며 관련사업을 선점한다.</p>					

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호	818014-2		
사업구분	농식품기술개발사업				
연구분야	동물육종번식		과제구분	단위	
사업명	농식품연구성과후속지원사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	한우수정란 배양액 및 이식배지 개발을 통한 수태율 향상 연구		과제유형	(기초,응용,개발)	
연구기관	(주)엠케이바이오텍		연구책임자	박연배	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2018.04~2018.12	75,000천원	25,000천원	100,000천원
	2차년도	2019.01~2019.12	1000,000천원	34,000천원	134,000천원
	3차년도				
	4차년도				
	5차년도				
	계	2018.04~2019.12	175,000천원	59,000천원	234,000천원
참여기업					
상대국		상대국연구기관			

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2020년 1월 20일

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
(주)엠케이바이오텍	책임연구원	박 연 배

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약	
-----------	--

I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수), 우수, 보통, 미흡, 불량)

기존의 한우 수정란 배양액은 해외수입에 의존하여왔으나, 국내자체 기술을 통한 배양액 생산 판매를 통해 낮아진 배양액 단가로 인해 수정란 생산 산업에 많은 기여를 했다고 볼 수 있음. 또한 수정란 이식을 함으로써 수정란 생산비용 감소로 농가의 수익증대뿐만 아니라 지자체 한우 브랜드 사업화에 기여하고 있다고 볼 수 있음

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수), 우수, 보통, 미흡, 불량)

국내 한우 맞춤형 수정란 생산 배양액은 국내에 있는 각 도 출산기술연구소 및 축산과학원 등 한우 수정란을 연구하고 개발하는 연구소에 판매되고 있음. 이로 인해 농가에서 저렴한 수정란을 공급받게 되고 능력이 좋은 소를 생산하여 일반 인공수정 한우 생산보다 1++등급의 출현율이 38.6% 상승한 것을 확인하였음. 이로써 경제적 파급효과가 크다고 볼 수 있음

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수), 우수, 보통, 미흡, 불량)

한우 수정란 배양 연구는 다른 포유동물들의 수정란 연구에 이용될 수 있음. 특히 염소, 사슴, 양과 같은 동물들의 수정란 이식 연구에 활용될 수 있음. 또한 개, 고양이, 돼지 같은 동물들의 체외배양 연구에도 활용될 것으로 기대됨. 더 나아가 사람의 수정란 배양을 통해 불임으로 인해 고통받는 환자들에게 도움이 될수 있는 연구 결과를 얻을 것으로 기대됨

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수), 우수, 보통, 미흡, 불량)

생물을 다루는 수정란의 경우 밤, 낮, 휴일을 따지지 않고 정확한 시간과 스케줄에 맞춰 진행되어야 함. 그러기 때문에 때로는 주말에 나와 연구개발을 위해 실험을 진행해야 하는 경우가 발생했고 그에 맞춰 우리 연구원들은 실험실에 나와 성실하게 실험을 진행했다고 볼 수 있음

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수), 우수, 보통, 미흡, 불량)

한우 수정란 배양 연구를 통해 수정란 저온보존을 통한 수정란 효과 연구 논문1건과 동결보존을 통한 수정란 효과에 대한 연구논문 1건 총 2건의 석사 논문이 발표 되었음. 이 연구를 통해 수정란이식 시간을 조절하여 수태율 향상을 위한 연구 자료에 활용 할 수 있게 되었고 이는 농가의 소득증가로 이어지게 되어 산업에 영향을 줄 수 있을 것으로 기대됨

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
미성숙 남자 세척용 배지 개발	14.3	100%	연구 개발 및 배양액 상품화에 성공 하였음
OPU 남자 세척용 배지 개발	14.3	100%	연구 개발 및 배양액 상품화에 성공 하였음
체외성숙 배지의 개발	14.3	100%	연구 개발 및 배양액 상품화에 성공 하였음
동결정액 세척용 배지 개발	14.3	100%	연구 개발 및 배양액 상품화에 성공 하였음
체외수정 배지의 개발	14.3	100%	연구 개발 및 배양액 상품화에 성공 하였음
체외배양 배지의 개발	14.3	100%	연구 개발 및 배양액 상품화에 성공 하였음
수정란 이식용 배지의 개발	14.3	100%	연구 개발은 완료 되고 상품화 준비중
합계	100점		

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 연구 결과를 통해 한우 수정란 이식 배양액을 개선하여 기존 수입 수정란 배양액에 의존 하였던 것을 국산화 하여 수정란 생산효율을 높였다고 볼 수 있음. 이로 인해 수정란의 생산 비용 절감을 통해 국내 축산업 농가에 수정란 이식이 활성화 되어 결과적으로 농가 소득증대를 이룰 것으로 기대됨. 이는 연구와 실제 산업이 적용되는 좋은 사례로 볼 수 있기에 타 연구에도 귀감이 될 수 있을 것으로 보임

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

체외 수정란 생산 연구는 초고도의 생명공학기술이 들어간 연구로 그 결과가 단기간에 발생 하지 않음. 또한 생물의 경우 일반적인 기성품과는 달리 실험자의 기술과 컨디션과 실험실 상황에 영향을 많이 받음. 그러므로 생명공학기술연구에는 많은 시간과 노력 기울이고 단기의 성과에만 평가하지 않고 점차적인 기술 성장을 봤으면 함

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

본 연구를 통해 체외 배양 기술을 개선하고 수정란 생산 효율을 증가 시켰으면 이는 수태율 향상으로 이어져 직접적인 한우 생산에 활용되어 농가의 수익증대를 이룰 수 있었다고 볼 수 있음. 또한 모든 포유동물의 발생 초기 배양 성장 단계는 유사 하므로 수정란 배양 연구에 활용되어 타 산업에 이용될 수 있을 것으로 보임. 향후 우리나라 체외수정란 배양연구에 더 많은 관심과 투자가 이루어 졌으면 함.

IV. 보안성 검토

○ 해당사항없음

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

2. 연구기관 자체의 검토결과

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제		분 야	동물육종번식
연구과제명	한우 수정란 배양액 및 이식배지 개발을 통한 수태율 향상 연구			
주관연구기관	(주)엠케이바이오텍		주관연구책임자	박연배
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	175,000천원	59,000천원		234,000천원
연구개발기간	2018.04.30.~2019.12.31. (20개월)			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(자체사업화)			
	<input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 난자 세척용 배지 개발 실험	1개 당 평균 28개 난자 회수
② OPU 세척용 배지 개발 실험	1마리 당 평균 15.8개 난자 회수
③ 체외성숙용 배지 개발 실험	체외 성숙 난자 81.4% 극체 형성
④ 동결정액 세척용 배지 개발 실험	정액 활력도 9% 증가, 운동성 5% 증가
⑤ 난자 및 정자 수정용 배지 개발 실험	체외수정률 81.6%
⑥ 수정란 배양용 배지 2종 개발 실험	수정란 생성률 41.5%
⑦ 수정란 이식용 배지 개발 실험	저온보존에 따른 시간별 생존율 24h 이후 97.9%

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기 타 (타 연 구 활 용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논 문		논 문 평 균 IF	학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
												SC I	비 SC I							
단위	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	60														40					
최종목표	2														1					
연구기간내 달성실적	2														1					
달성율(%)	100														100					

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	수정란 이식기술을 이용한 고능력 한우의 대량생산방법
②	각각의 수정란을 공동배양 할 수 있는 배양 접시
③	개체 배양이 가능한 수정란 배양 접시
·	
·	
·	

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복 제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장으로 해 결	정책 자료	기타
①의 기술						v	v	v		
②의 기술		v				v	v	v		
③의 기술		v				v	v	v		
·										
·										

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	- 수정란 생산효율성 향상으로 활용성 증가, 수태율 향상으로 인한 농가소득 증대
②의 기술	- 수정란생산 방법의 고안 및 수정란 생산효율 증가
③의 기술	- 연구방법 개선 및 용의성 증대, 관련분야 활용성 증가
:	

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용-홍보		기타 (타 연구활용등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책활용	홍보전시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명				
가중치	60														40				
최종목표	1														1				
연구기간내 달성실적																			
연구종료후 성과창출 계획	1														1				

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

해당사항 없음