



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년04월16일
(11) 등록번호 10-1512380
(24) 등록일자 2015년04월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61D 19/02 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0008831

(22) 출원일자 2014년01월24일

심사청구일자 2014년01월24일

(56) 선행기술조사문헌

US06596310 B1*

US05744337 A*

US06987137 B1

US08202558 B2

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

홍순택

대전 서구 복수동로 21-19, 107동 802호 (복수동, 초록마을1단지)

김민규

대전 중구 수침로 122, 101동 703호 (태평동, 푸른피아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이원희

전체 청구항 수 : 총 6 항

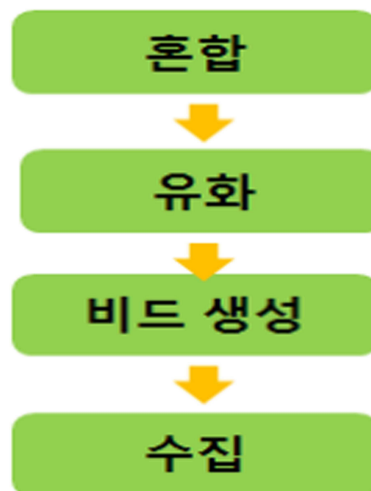
심사관 : 강성현

(54) 발명의 명칭 인공수정용 캡슐화 가축 정자 비드의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 인공수정용 캡슐화 가축 정자 비드 제조방법에 관한 것으로, 대량생산 체계에 적합한 유화(emulsion) 기술을 이용하여 가축 정자를 비드(bead) 형태로 캡슐화하여 안정적으로 우수한 정자를 보급 및 대량생산을 할 수 있음을 확인하였으며, 상기 가축 정자 비드는 방출(release) 시 충분한 회수율을 보유하고 있는 것을 확인함으로써, 인공수정용 캡슐화 가축 정자 비드 제조방법으로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

이의석

대전 유성구 유성대로821번길 24-10, 103호 (장대동, 마당빌라)

박강선

경남 밀양시 산외면 산외로 705,

김산성

대전 동구 동대전로309번길 24, A동 302호 (가양동, 대림빌라)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013-B-7191-010102

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 LNC 사업

연구과제명 돼지정자 캡슐화를 통한 저장성 향상에 관한 연구

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교 산학협력단

연구기간 2013.07.01 ~ 2013.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

- (i) 액상형태의 가축 정자와 캡슐화 물질로서 K-카라기난(K-carrageenan), 알긴산나트륨(Na-alginate), 젤라틴 및 한천으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나를 혼합하여 혼합액을 제조하는 단계;
- (ii) 상기 단계 (i)의 혼합액을 15 내지 45℃의 식용유에 첨가하고 10 내지 60분 동안 교반하여 W/O 유화액을 제조하는 단계;
- (iii) 상기 단계 (ii)의 W/O 유화액에 KCl, CaCl₂ 및 BaCl₂로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나를 첨가하여 해유화한 후 냉각 및 교반한 다음 정치하여 가축 정자 비드(bead)를 형성하는 단계; 및
- (iv) 단계 (iii)의 가축 정자 비드를 100 내지 500 메쉬로 통과시킨 후 완충액 또는 살균 증류수로 세척하여 수집하는 단계를 포함하는 인공 수정용 캡슐화 가축 정자 비드의 제조 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 단계 (i)의 혼합액은

- (a) 완충액(buffer) 또는 살균 증류수에 친수성 유화제를 첨가하는 단계;
- (b) 캡슐 물질을 첨가한 후 70℃ 내지 100℃에서 용해 시킨 후 15 내지 45℃로 냉각 시키는 단계;
- (c) 가축 정액을 첨가한 후 교반 시키는 단계를 포함하는 방법으로 제조하는 것을 특징으로 하는, 인공 수정용 캡슐화 가축 정자 비드의 제조 방법.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제 2항에 있어서, 상기 단계 (a)의 친수성 유화제는 트윈류(Tweens), 친수성 자당지방산 에스테르(HLB 12-18) 및 SSL(sodium stearyl lactylate)로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 인공 수정용 캡슐화 가축 정자 비드의 제조 방법.

청구항 6

삭제

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 단계 (ii)의 식용유는 카놀라유, 올리브유, 해바라기유, 옥수수, 포도씨유, 옥수수 및 콩기름으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 인공 수정용 캡슐화 가축 정자 비드의 제조 방법.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

제 1항의 방법으로 제조된, 인공 수정용 캡슐화 가축 정자 비드.

청구항 12

(i) 액상형태의 가축 정자와 캡슐화 물질로서 K-카라기난(K-carrageenan), 알긴산나트륨(Na-alginate), 젤라틴 및 한천으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나를 혼합하여 혼합액을 제조하는 단계;

(ii) 상기 단계 (i)의 혼합액을 15 내지 45℃의 식용유에 첨가하고 10 내지 60분 동안 교반하여 W/O 유화액을 제조하는 단계;

(iii) 상기 단계 (ii)의 W/O 유화액에 KCl, CaCl₂ 및 BaCl₂로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나를 첨가하여 해유화한 후 냉각 및 교반한 다음 정치하여 가축 정자 비드(bead)를 형성하는 단계; 및

(iv) 상기 단계 (iii)의 가축 정자 비드를 100 내지 500 메쉬로 통과시킨 후 완충액 또는 살균 증류수로 세척하여 수집하는 단계를 포함하는, 액상 형태의 가축 정자의 저장성 개선 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 인공수정용 캡슐화 가축 정자 비드(bead), 이의 제조방법, 및 상기 캡슐화 가축 정자 비드를 이용하여 정자의 저장성 개선 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

최근에 국내의 양돈 산업은 사육 농가 수는 점차 감소하는 반면에 농가당 사육두수는 증가하고 있으며, 이는 국민 소득증대의 증가에 따른 1인당 육류소비량의 증가와 연관된 것으로 보인다. 실제로 통계청의 최근 5년간 돼지의 출하두수는 38% 증가하여 소비자의 육류소비량 증가에 대한 수요는 만족시키고 있는 것으로 나타났다. 그러나 전체 출하두수의 4%만 A+등급의 고급육으로 출하되고 있어서 육류 소비량 증가에 따라 고급육 수요에 대한 공급 물량은 부족한 실정을 파악되고 있다.

[0003]

고급육의 돼지를 생산하기 위해서는 우수한 정자 보급을 통한 번식과 더불어 적절한 사양관리가 중요하다. 현재 국내 양돈농가 80% 이상이 액상 형태의 정액(액상정액)을 이용한 인공수정 번식 시스템을 이용하고 있는데, 이는 동결정액이 우수한 유전자원 보존, 장거리 수송 및 보존 등의 많은 장점을 지니고 있음에도 불구하고 해동 후 정자의 생존력이 낮아져 정상적인 수정 능력을 보유하기에는 한계점을 나타내므로 대부분 농가에서 액상정액을 선호·사용하게 된다. 한편, 액상정액은 통상 17℃에서 저장·유통하는데, 이 경우 저장 3일째부터 정자의 운동성이 유의적으로 저하되며 4일째부터는 침체 변화가 발생하여 수정능이 낮아진 정자의 수가 증가하는 것으로 알려져 있다. 게다가 액상정액은 팩(Pack) 또는 튜브(Tube)에 포장되어 유통되는데, 이로 인하여 액상정액

의 단가가 상승되어 액상정자의 저장성 개선과 더불어 유통 비용의 감소를 위한 연구가 필요한 실정이다.

[0004]

[0005]

이러한 문제점들을 보완하기 위해, 1985년 Nebel에 의해 돼지정자에 캡슐화 기술을 접목시켜서 최초로 성공하였고, Jonathan van Blerkom은 캡슐화 물질의 농도 및 처리 시간에 따른 캡슐사이즈 및 강도변화, 정자의 생존성에 대한 연구를 수행하였으며, 최근 이탈리아의 토레(Torre)와 파우스티니(Faustini)는 압출타입(extrusion type)의 캡슐화(encapsulation) 기술을 이용하여 염화바륨($BaCl_2$)을 처리하여 비드 젤(bead gel)의 강도를 증가시켜 보존력을 증진시켰다. 국내에서도 동결 정액 연구 및 액상 정액의 저장성을 향상하기 위해 희석액에 당류 및 향산화제 등을 첨가하여 저장성 증진 연구를 수행 하였으나, 아직까지 액상형태로 2주 이상의 장기간 보존은 불가능한 것으로 보고되고 있다.

[0006]

이에, 본 발명자들은 액상 정액의 저장성 개선 및 우수한 형질의 가축에서 생산되는 정액을 보다 효율적으로 생산 및 유통시킬 방안을 규명하기 위하여 노력한 결과, 대량생산 체계에 적합한 유화(emulsion) 기술을 이용하여 가축 정자를 비드(bead) 형태로 캡슐화하여 안정적으로 우수한 정자를 보급 및 대량생산을 할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007]

본 발명의 목적은 인공수정용 캡슐화 가축 정자 비드(bead), 이의 제조방법, 및 상기 캡슐화 가축 정자 비드를 이용하여 정자의 저장성 개선 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008]

상기 목적을 달성하기 위하여,

[0009]

본 발명은

[0010]

(i) 액상형태의 가축 정자와 캡슐화 물질을 혼합하여 혼합액을 제조하는 단계;

[0011]

(ii) 상기 단계 (i)의 혼합액을 유화시켜 W/O 유화액을 제조하는 단계;

[0012]

(iii) 상기 단계 (ii)의 W/O 유화액을 해유화시켜 가축 정자 비드(bead)를 형성하는 단계; 및

[0013]

(iv) 상기 단계 (iii)의 가축 정자 비드를 수집하는 단계를 포함하는 인공 수정용 캡슐화 가축 정자 비드의 제조 방법을 제공한다.

[0014]

또한, 본 발명은 본 발명에 따른 방법으로 제조된, 인공 수정용 캡슐화 가축 정자 비드를 제공한다.

[0015]

또한, 본 발명은

[0016]

(i) 액상형태의 가축 정자와 캡슐화 물질을 혼합하여 혼합액을 제조하는 단계;

[0017]

(ii) 상기 단계 (i)의 혼합액을 유화시켜 W/O 유화액을 제조하는 단계;

[0018]

(iii) 상기 단계 (ii)의 W/O 유화액을 해유화시켜 가축 정자 비드(bead)를 형성하는 단계; 및

[0019]

(iv) 상기 단계 (iii)의 가축 정자 비드를 수집하는 단계를 포함하는, 액상 형태의 가축 정자의 저장성 개선 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0020]

본 발명은 인공수정용 캡슐화 가축 정자 비드 제조방법에 관한 것으로, 대량생산 체계에 적합한 유화(emulsion) 기술을 이용하여 가축 정자를 비드(bead) 형태로 캡슐화하여 안정적으로 우수한 정자를 보급 및 대량생산을 할

수 있음을 확인하였으며, 상기 가축 정자 비드는 방출(release) 시 충분한 회수율을 보유하고 있는 것을 확인함으로써, 인공수정용 캡슐화 가축 정자 비드 제조방법으로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 돼지정자 비드(bead) 제조기술 공정에 관한 흐름도이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 돼지정자 비드 제조기술 공정중 혼합공정에 관한 흐름도이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 돼지정자 비드 제조기술 공정중 W/O 유화공정에 관한 흐름도이다.
- 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 돼지정자 비드 제조기술 공정중 해유화 및 돼지정자 bead 형성공정에 관한 흐름도이다.
- 도 5은 본 발명의 일 실시예에 따른 돼지정자 비드 제조기술 공정 중 돼지정자 bead 수집공정에 관한 흐름도이다.
- 도 6은 본 발명을 통해 얻은 캡슐화 돼지정자 비드의 현미경 사진이다.
- 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 돼지정자 비드 제조 전, 후 돼지정자의 모습이다.
- 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 돼지정자 비드의 방출(release) 전, 후 돼지정자의 모습이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0023] 본 발명은 대량생산체계에 적합한 유화(emulsion) 기술을 이용하여 가축 정자의 비드(bead) 캡슐화 제조 방법에 관한 것으로서, 액상의 가축 정자를 캡슐화 물질(wall material)과 혼합하는 과정, W/O 유화과정, 비드 생성과정 및 수집과정의 4가지 공정을 순차적으로 거쳐 인공 수정용 캡슐화 가축 정자 비드를 제조하였다.
- [0024] 본 발명은
- [0025] (i) 액상형태의 가축 정자와 캡슐화 물질을 혼합하여 혼합액을 제조하는 단계;
- [0026] (ii) 상기 단계 (i)의 혼합액을 유화시켜 W/O 유화액을 제조하는 단계;
- [0027] (iii) 상기 단계 (ii)의 W/O 유화액을 해유화시켜 가축 정자 비드(bead)를 형성하는 단계; 및
- [0028] (iv) 상기 단계 (iii)의 가축 정자 비드를 수집하는 단계를 포함하는 인공 수정용 캡슐화 가축 정자 비드의 제조 방법을 제공한다.
- [0029] 상기 본 발명에 따른 단계 (i)의 가축 정자는 돼지, 소, 양, 말 및 염소로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0030] 상기 본 발명에 따른 단계 (i)의 혼합액은
- [0031] (a) 완충액(buffer) 또는 살균 증류수에 친수성 유화제를 첨가하는 단계;
- [0032] (b) 캡슐 물질을 첨가한 후 70℃ 내지 100℃에서 용해 시킨 후 15 내지 45℃로 냉각 시키는 단계;
- [0033] (c) 가축 정액을 첨가한 후 교반시키는 단계를 포함하는 방법으로 제조하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0034] 상기 본 발명에 따른 단계 (ii)의 캡슐화 물질은 1 내지 3%의 K-카라기난(K-carrageenan), 알긴산나트륨(Na-alginate), 젤라틴 및 한천으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0035] 상기 본 발명에 따른 단계 (a)의 친수성 유화제는 0.1 내지 1%의 트윈류(Tweens), 친수성 자당 지방산 에스테르(HLB 12-18) 및 SSL(sodium stearyl lactylate)로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것이 바람직하나,

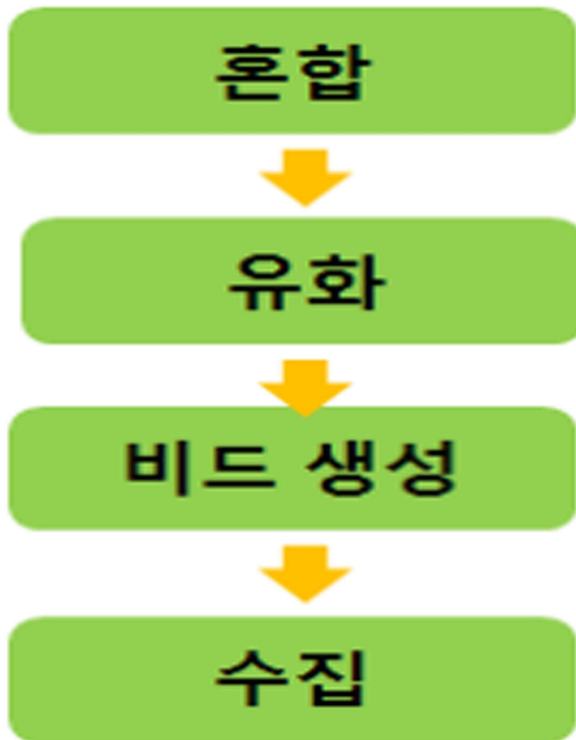
이에 한정되지 않는다.

- [0036] 상기 본 발명에 따른 단계 (a)의 완충액(buffer)는 pH 5 내지 8로 구성된 군으로 부터 선택된 어느 하나인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0037] 상기 본 발명에 따른 단계 (ii)의 W/O 유화액은
- [0038] (a) 식용유를 15 내지 45℃로 가온하는 단계; 및
- [0039] (b) 가온된 식용유에 가축 정자 혼합액을 첨가한 후, 교반하는 단계를 포함하는 방법으로 제조하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0040] 상기 본 발명에 따른 단계 (a)의 식용유는 카놀라유, 올리브유, 해바라기유, 옥수수, 포도씨유, 옥수수 및 콩기름으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0041] 상기 단계 (iii)의 가축 정자 비드는
- [0042] (a) W/O 유화액에 KCl 용액을 첨가하여 해유화 하는 단계; 및
- [0043] (b) 해유화액을 냉각 및 교반한 후 정치하는 단계를 포함하는 방법으로 제조하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0044] 상기 본 발명에 따른 단계 (a)의 해유화 용액은 KCl, CaCl₂ 및 BaCl₂ 로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0045] 상기 본 발명에 따른 단계 (a)의 KCl 용액의 농도는 50 내지 200 mM인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0046] 상기 본 발명에 따른 단계 (a)의 KCl 용액의 온도는 15 내지 45℃인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0047] 상기 본 발명에 따른 단계 (b)의 정치 온도는 10 내지 20℃인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0048] 상기 본 발명에 따른 단계 (iv) 가축 정자 비드의 수집은
- [0049] (a) 거즈 또는 100 내지 500 메쉬로 통과 시키는 단계; 및
- [0050] (b) 완충액 또는 살균 증류수로 세척하는 단계를 포함하는 방법으로 수행하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0051] 상기 본 발명에 따른 단계 (b)의 완충액 또는 살균 증류수의 용량은 10 내지 20 mM인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0052] 상기 본 발명에 따른 단계 (b)의 완충액 또는 살균 증류수로 세척하는 단계는 2 내지 5회인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0053] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 본 발명에 따라 액상 돼지 정자를 캡슐화 물질(wall material)과 혼합 과정, W/O 유화과정, 비드 생성과정 및 수집과정 등의 4가지 공정(도 1 내지 도 5 참조)을 순차적으로 거쳐 인공수정용 캡슐화 돼지정자 비드를 제조(도 6 참조)한 결과, 본 발명에 따른 인공수정용 캡슐화 돼지정자 비드는 팩(pack) 또는 튜브(tube)에 포장되어 유통되는 액상정자보다 저장성이 우수하였으며, 캡슐화된 돼지정자를 방출하였을 때 우수한 회수율을 나타내는 것을 확인하였다(도 7 및 도 8 참조).
- [0054] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 방법으로 제조된 인공 수정용 캡슐화 가축 정자 비드를 제공한다.
- [0055] 상기 가축 정자는 돼지, 소, 양, 말 및 염소로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0056] 또한, 본 발명은
- [0057] (i) 액상형태의 가축 정자와 캡슐화 물질을 혼합하여 혼합액을 제조하는 단계;
- [0058] (ii) 상기 단계 (i)의 혼합액을 유화시켜 W/O 유화액을 제조하는 단계;

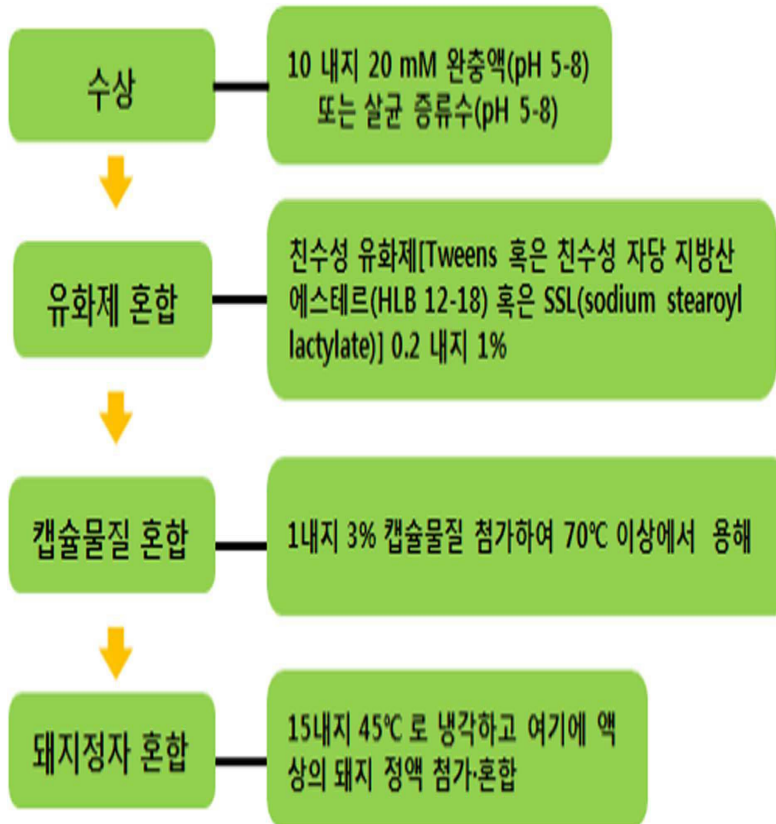
- [0059] (iii) 상기 단계 (ii)의 W/O 유화액을 해유화시켜 가축 정자 비드(bead)를 형성하는 단계; 및
- [0060] (iv) 상기 단계 (iii)의 가축 정자 비드를 수집하는 단계를 포함하는, 액상 형태의 가축 정자의 저장성 개선 방법을 제공한다.
- [0061] 상기 본 발명에 따른 단계 (i)의 가축 정자는 돼지, 소, 양, 말 및 염소로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0062] 이하에서는 본 발명의 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.
- [0063] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0064] **<실시예 1> 액상의 돼지정자 및 캡슐화 물질(wall material)의 혼합하는 과정**
- [0065] 10 내지 20 mM 완충액(pH 5내지 8)에 친수성 유화제 0.1 내지 1%를 첨가한 후, 상기 혼합물에 염색시약(Safranin)을 첨가한 다음, 1 내지 3% 캡슐물질 K-카라기난(K-Carrageenan), 알긴산나트륨(Na-alginate), 젤라틴 또는 한천을 첨가한 후, 70℃ 이상에서 용해한 후, 35 내지 45℃에서 냉각하고 충남축산기술연구소에서 제공받은 돼지 정자액(충남축산기술연구소, 한국)을 첨가한 다음, 교반하였다.
- [0066] **<실시예 2> W/O 유화하는 과정**
- [0067] 상기 <실시예 1>에 기재된 방법으로 제조한 돼지정자 혼합액을 15 내지 45℃의 식용유에 첨가하고 교반기 100 내지 300 rpm 상태에서 10 내지 60분 동안 교반하였다.
- [0068] **<실시예 3> 비드 생성 과정**
- [0069] 상기 <실시예 2>에 기재된 방법으로 제조한 W/O 돼지 정자 유화액에 50 내지 200 mM KCl 용액을 상기 유화액 중량의 2배로 첨가하여 해유화 시킨 후, 10 내지 20℃에서 100 내지 300 rpm으로 10 내지 60분 교반 시킨후, 상온에서 10 내지 60분 동안 정치시켰다.
- [0070] **<실시예 4> 비드 수집 과정**
- [0071] 상기 <실시예 3>에 기재된 방법으로 제조한 비드(Bead) 혼합물을 100 내지 500 메쉬(mesh)인 표준체를 사용하여 여과시킨 후, 10 내지 20 mM 완충액(pH 5내지 8)으로 2 내지 5회 세척하여 캡슐화 돼지정자 비드를 수득하였다. 그런 다음, 상기 수득된 돼지 정자 비드 크기는 광학현미경(Cx-21, Olympus, Japan)을 사용하여 40 배율로 측정하였다.
- [0072] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 돼지 정자 비드의 크기는 500 내지 700 μm 정도로 측정되었다(도 6).
- [0073] 또한, 도 7에 나타난 바와 같이, 돼지 정액 비드를 제조하기 전 돼지 정자의 모습과 돼지 정자 비드를 제조한 후 돼지정자의 모습을 관찰하였을 때, 상기 돼지 정자를 제조한 후 돼지정자는 캡슐물질 막 안에 쌓여 있는 모습을 관찰하였다(도 7).
- [0074] 아울러, 도 8에 나타난 바와 같이, 돼지 정자 비드를 제조한 후 돼지 정자는 캡슐물질 막에 둘러싸여 방출되지 않았으며, 캡슐물질을 제거시킨 후 돼지 정자가 방출되는 것을 확인하였다(도 8).

도면

도면1



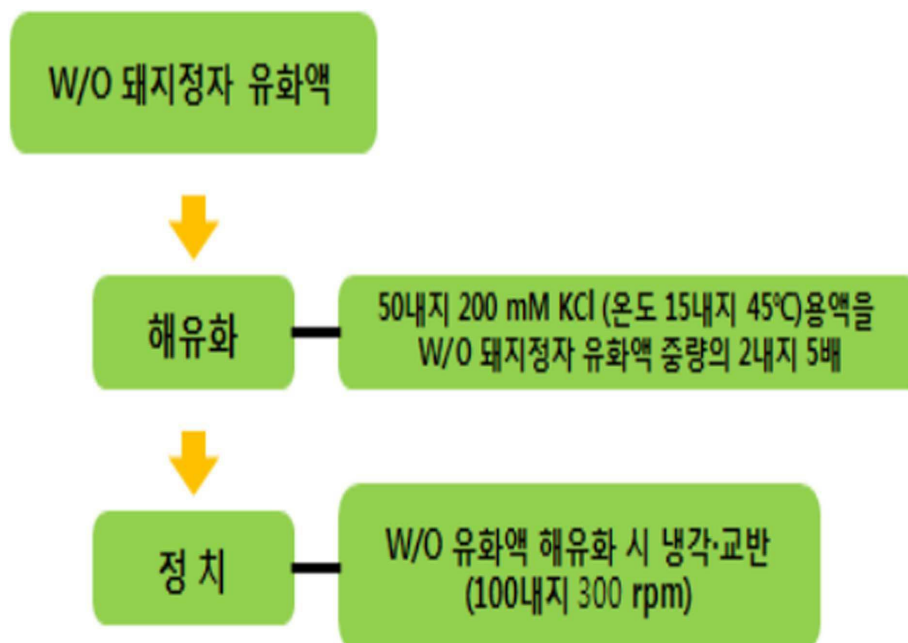
도면2



도면3



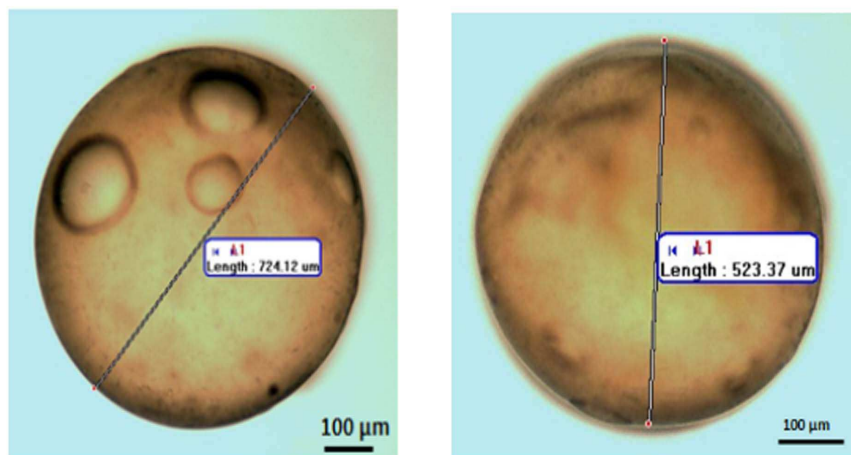
도면4



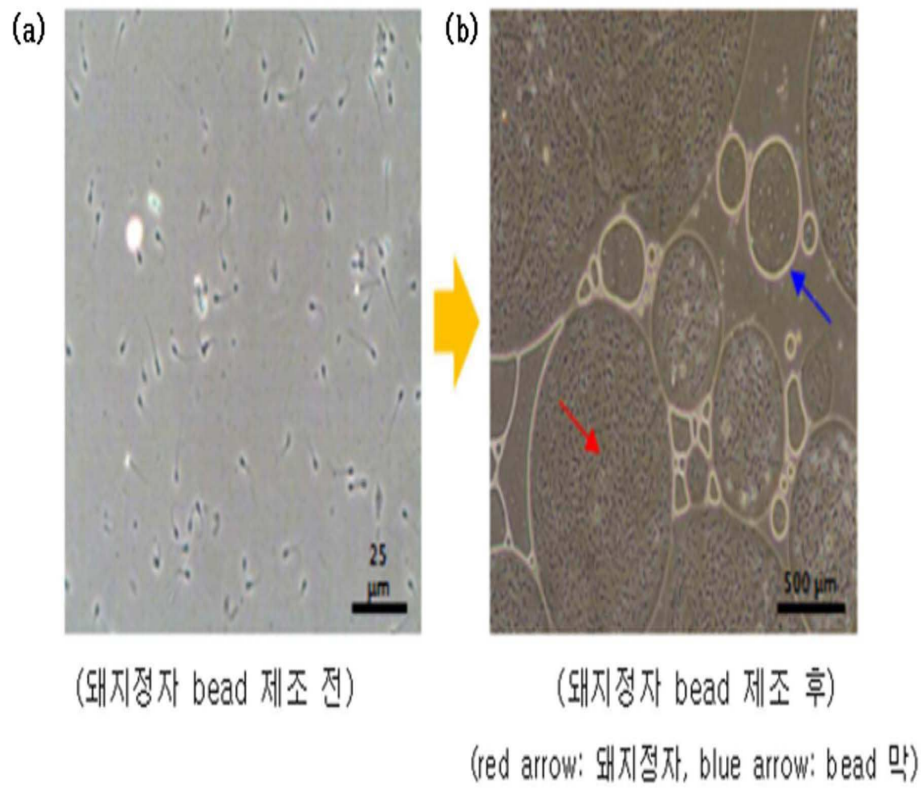
도면5



도면6



도면7



도면8

