

(19)대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup> (45) 공고일자 2005년09월13일  
A61D 19/02 (11) 등록번호 10-0515011

(24) 등록일자 2005년09월07일

(21) 출원번호 10-2003-0054947

(65) 공개번호 10-2005-0017634

(22) 출원일자 2003년08월08일

(43) 공개일자 2005년02월22일

(73) 특허권자 대한민국

(72) 발명자 안철민  
부산광역시해운대구좌동1298건영2차아파트110동501호

민광식  
부산광역시해운대구우2동대우동삼아파트102동505호

지영주  
부산광역시해운대구좌동1414건영1차아파트310동1702호

김성연  
부산광역시해운대구우2동삼환아파트105동105호

김대중  
부산광역시해운대구우1동경동아파트107동804호

(74) 대리인 특허법인우린

심사관 : 이충호

(54) 범가자미 정자 냉장보존을 위한 인공정장

요약

본 발명은 범가자미 정자 냉장보존을 위한 인공정장에 관한 것으로서, 범가자미의 정액 중 정장의 이온조성  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  및 이들의 함량과 동일하도록  $KCl$ ,  $NaCl$ ,  $CaCl_2$ ,  $MgCl_2$ ,  $NaH_2PO_4$ ,  $NaHCO_3$  및 Glucose를 포함하여 구성되는 물질을 혼합하여 얻어지는 인공정장을 제공한다. 본 발명에 따르면, 범가자미로부터 추출된 정자를 냉장상태로 3주 이상 안전하게 보관할 수 있다.

대표도

도 2b

색인어

범가자미, 양식, 정장, 냉장보존, 인공정장

## 명세서

### 도면의 간단한 설명

도 1a는 본 발명에 따른 인공정장의 정자 냉장보존능력을 0℃에서 실험한 결과를 보여주는 그래프.

도 1b는 본 발명에 따른 인공정장의 정자 냉장보존능력을 2℃에서 실험한 결과를 보여주는 그래프.

도 1c는 본 발명에 따른 인공정장의 정자 냉장보존능력을 4℃에서 실험한 결과를 보여주는 그래프.

도 2a는 본 발명에 따른 냉장보존 능력이 향상된 인공정장의 정자 냉장보존능력을 실험한 결과를 보여주는 그래프.

도 2b는 본 발명에 따른 냉장보존 능력이 향상된 또 다른 인공정장의 정자 냉장보존능력을 실험한 결과를 보여주는 그래프.

### 발명의 상세한 설명

#### 발명의 목적

#### 발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 어류의 인공정장에 관한 것으로, 좀더 구체적으로는 범가자미의 정자를 체외에서 냉장보존하기 위한 인공정장에 관한 것이다.

범가자미(spotted flounder, *Verasper variegatus*)는 전장 60cm, 체중 5.0kg까지 성장하는 대형종으로서, 맛이 좋을 뿐 아니라 체형, 체색 등의 시각적 측면에서도 기호성이 높으며, 또한 저수온에 강하여 수온 10~15℃에서도 먹이를 잘 먹음으로써 동절기의 양식가능 어종으로서 크게 각광을 받고 있다.

또한 가자미과 어류는 현재의 넙치 양식시설을 최대한 효율적으로 이용할 수가 있으므로 양식 대상종으로 개발하기 위한 연구가 지속적으로 이루어지고 있다.

현재 범가자미의 양식개발 수준은 양식의 필수 단계인 종묘생산이 이루어지지 않고 있는 극히 기초 단계이다. 이러한 원인으로서는 범가자미의 자연 생태에 대한 정보 부족과 어획부진으로 인한 구입의 어려움 등으로 수조내에서 자연산란이 이루어지지 않고 있는 점, 어획시 암컷 보다 수컷이 매우 적으며, 이로 인하여 배란된 암컷이 있어도 동시에 채정 가능한 수컷이 없어 인공수정이 어려운 점, 또한 복부압박에 의한 체정시 성숙한 수컷 1마리에서 2~3 방울의 정액밖에 얻을 수 없을 만큼 정액의 양이 적은 점, 그리고 사육수조에서 사육시 암컷은 성숙하여 완숙란을 채란할 수 있는데 비하여, 수컷은 정액을 채정할 수 없어 인공수정이 어려운 점 등을 들 수 있다.

따라서, 현재로서는 사육중인 범가자미 수컷으로부터 정액을 채정하여 보존하고 있으면서 완숙란의 채란 시 이를 이용하여 인공수정시키는 방법이 효과적인 것으로 생각하고 있으며, 범가자미의 양식 산업화를 위해서는 정자의 안정적인 확보가 무엇보다 중요하다.

어류 정자의 보존은 양식하기 어려운 어종의 새로운 인공종묘생산을 위한 인공수정을 위하여 필요한 것으로 알려져 있으며, 특히 외관상으로는 어류의 성숙이 확인되더라도 동시에 난과 정자를 채란, 채정할 수 없는 어종에서 매우 필요하다. 또한, 어류의 동일 종간에 육종을 위하여나 잡종 생산을 위하여도 정자를 보존하여 사용하는 방법이 경제적으로도 매우 유용한 것으로 평가받고 있다.

일반적으로 동물의 정자는 체외로 방출되었을 때에는 일정 기간 이상 생존하지 못한다. 따라서 동물의 정자를 체외에서 일정 기간 이상 보존하기 위하여는 정자가 체외에서도 운동을 하지 않아 정자의 생명 유지에 필요한 에너지를 보존할 수 있는 보존액이 필요하다.

동물 중에서 어류는 특히 서식 환경이 수중이라는 특수성으로 인하여 정자의 보존성에 많은 문제를 포함하고 있으며, 그 종류가 매우 다양하기 때문에 어종에 따라 정자의 특성과 그 보존방법은 다르다고 알려져 있다.

현재, 어류의 정자 보존법은 주로 장기간 보존할 수 있는 냉동보존에 치우쳐 있으며, 일부에서는 정자의 운동 환경에 대한 기초적 연구가 진행되고 있으나, 양식 산업화를 위한 인공정장 개발과 관련된 연구는 미비한 실정이다.

현재 정자를 보존하기 위한 방법으로는 냉동보존(-196℃)과 냉장보존(0℃~4℃ ; 냉장고에서 보관할 수 있는 온도)이 있다. 그 중 냉장보존에는 정액 그대로 보존하는 방법과 정액을 보존액에 희석하여 보존하는 방법이 있다. 일반적으로 1주일 이내의 단기간에 사용하기 위해서는 정액 그대로 보존하는 방법이 활용되기도 하지만, 그 이상의 기간에는 적용 불가능하다.

어류의 종류는 매우 다양하여 우리나라에만 800 여종이 어류도감에 보고되고 있으며, 이들의 생식현상은 제각기 달라서 어류의 혈액 조성, 정액 조성 등 어류에 공통적으로 적용될 수 있는 인공정장은 있을 수 없다. 따라서, 각각의 어류의 정자를 냉장보존하기 위해서는 해당 어류만의 보존액을 만들어야 한다.

그러나, 아직까지 범가자미의 정자를 체외에서 일정 기간 이상 냉장보관할 수 있는 인공정장에 대해서는 개발되지 못하고 있는 실정이다.

### 발명이 이루고자 하는 기술적 과제

따라서, 본 발명의 목적은 범가자미로부터 추출된 정자를 범가자미 체외에서 냉장보존할 수 있는 인공정장을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 범가자미로부터 추출된 정자를 일정 기간 안전하게 보존할 수 있는 인공정장을 제공하는 것이다.

기타, 본 발명의 다른 목적 및 특징은 후술하는 상세한 설명 및 특허청구범위에서 명확히 나타날 것이다.

### 발명의 구성 및 작용

상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 특징에 따르면, 본 발명은 범가자미의 정액 중 정장의 이온조성  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  및 이들의 함량과 동일하도록  $KCl$ ,  $NaCl$ ,  $CaCl_2$ ,  $MgCl_2$ ,  $NaH_2PO_4$ ,  $NaHCO_3$  및 Glucose를 포함하여 구성되는 물질을 혼합하여 얻어지고, 인공정장의 pH 조절을 위하여 HEPES를 포함하여, 상기 각 성분들의 함량은 mM/L 단위로  $KCl$ 은 4.75,  $NaCl$ 은 102.36,  $CaCl_2$ 은 2.9,  $MgCl_2$ 은 7.12,  $NaH_2PO_4$ 은 0.7,  $NaHCO_3$ 은 7.0, Glucose는 2.0 및 HEPES는 10임을 특징으로 한다.

### 삭제

또한, 본 발명은  $KCl$  및  $CaCl_2$ 중 어느 하나와,  $NaCl$ ,  $MgCl_2$ ,  $NaH_2PO_4$ ,  $NaHCO_3$ , Glucose 및 HEPES를 포함하여 구성되며, 각 성분의 함량은 백분율로  $KCl$  및  $CaCl_2$ 중 어느 하나는 2.6~3.5,  $NaCl$ 은 76.0~82.8,  $MgCl_2$ 은 2.1~8.4,  $NaH_2PO_4$ 은 0.3~0.5,  $NaHCO_3$ 은 4.6~5.2, Glucose는 0.9~2.1 및 HEPES는 6.5~7.4인 범가자미 정자 냉장보존을 위한 인공정장을 제공한다.

상기 인공정장은 범가자미로부터 추출된 정자를 냉장상태로 3주 이상 안전하게 보관할 수 있다.

모든 동물의 정자는 정소 내에서는 생존하고 있으며 정자는 정소 내에서 정자를 둘러싸고 있는 정장과 함께 정액을 구성한다. 본 발명에서는 정액 중 정자를 둘러싸고 있는 정장을 인공적으로 개발하여 정자의 냉장보존에 사용하게 되었다. 조사 결과, 범가자미 인공정장이 정액 그대로 냉장보존 하였을 때 보다 보존 성과가 우수하였음을 밝혀내었다.

특히, 범가자미 정자의 냉장보존 효율을 높이기 위하여 범가자미 정자의 활력에 영향을 미칠 것으로 예상되는 인공정장의 구성 성분을 각각 달리 하여 정자를 냉장보존 할 수 있는 보존기간을 획기적으로 향상시킨 인공정장을 개발하였다.

범가자미 정자의 성분 분석

인공정장의 제조를 위하여, 사육중인 범가자미로부터 정액을 채취하여, 정장을 분리시킨 후, 그 구성성분 및 함량, 그리고 특성을 조사하였다.

범가자미 수컷의 복부를 가볍게 압박하여 정액을 채취한 후, 이들 정액을 12,000rpm으로 15분간 원심분리시킨 후 그 상등액, 즉 정장을 추출하였다. 추출된 정장은 성분 및 특성 분석 때까지 -80℃ 초저온냉동고에 보관하였다.

보관한 정장을 가지고 성분의 조성 및 삼투압, pH, 전해질 분석을 실시하여, 그 결과를 표 1에 나타내었다

**표 1.**  
범가자미 정장의 성분 조성 및 특성 분석 결과

	Property (mM/L)					삼투압 mOsm/kg	pH
	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>		
정장	5.3	168	152	2.8	15.9	335	6.94

표 1의 각 이온 조성은 실제 범가자미 정액의 정장을 구성하는 성분을 물질 분석시스템인 전해질분석기로 조사한 것으로서, 상기 성분들은 정자의 운동성 보존과 관련 있다고 판단되는 이온들의 조성이다.

인공정장의 개발

표 1의 범가자미 정장의 분석 결과를 토대로 인공정장을 개발하였다. 표 1의 각 이온 성분들의 조성을 바탕으로 인공정장 제조에 필요한 여러 물질들의 각 첨가량을 결정하였다. 본 발명에서 개발한 인공정장의 성분 및 조성은 다음의 표 2와 같다.

**표 2.**  
범가자미의 인공정장 조성 (단위 : mM/L)

KCl	NaCl	CaCl <sub>2</sub>	MgCl <sub>2</sub>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	NaHCO <sub>3</sub>	Glucose	HEPES
4.75	102.36	2.9	7.12	0.7	7.0	2.8	10

표 1의 결과로부터 정장에서 정자의 운동성 보존(즉, 운동성 억제)에 관련되는 이온들인 K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, 을 얻기 위하여 사용된 물질로는 KCl, NaCl, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, 이며, 이 밖에 정자의 운동성 보존 및 에너지원으로 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, Glucose 등을 첨가하였으며, HEPES (N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid])로서 pH를 보정하기 위한 완충액(buffers)으로 사용하였다.

이렇게 제조된 인공정장은 pH 8.0 상태로 준비한 후, 냉장고에서 보관하여 사용할 수 있다. 이 인공정장에 범가자미 수컷으로부터 채취한 정액을 희석하여 냉장고에서 보존하면서 암컷으로부터 채란한 알과 수정시키는 것이다.

인공정장의 정자 보존성

이와 같이 제조한 인공정장을 사용하여 정자의 보존성을 조사하였다. 보존 실험은 범가자미 인공정장의 냉장온도별 정자 보존효과를 판단하였다.

채취한 범가자미 정액을 신선한 상태 그대로 보관 용기에 넣은 것과, 본 발명에 따라 개발된 인공정장에 10배 희석한 후, 보관 용기에 넣은 것을, 각각 0℃, 2℃, 4℃ 온도 조건의 인큐베이터에 보존하였다.

보존 효과의 판정은 냉장보관된 용기 내의 정자를 인공해수에 희석하여 관찰용 슬라이드글라스 위에 4μl 점적하고, 그 속의 정자 활성을 CCTV 장치가 있는 현미경하에서 녹화하였으며, 녹화된 화면을 느린 속도로 재생하면서 정자의 운동활성도를 다음과 같이 점수화하여 판정하였다.

Score 1 : 직선 운동하는 정자가 0-25%일 때

Score 2 : 직선 운동하는 정자가 25-50%일 때

Score 3 : 직선 운동하는 정자가 50-75%일 때

Score 4 : 직선 운동하는 정자가 75-100%일 때

정자 냉장보존 실험 결과를 온도 조건에 따라 각각 도 1a 내지 1c에 도시하였다. 범가자미 인공정장에 보관된 정자는 보관 온도 0℃에서 16일, 2℃에서 23일 4℃에서는 10일간 각각 보존 가능하였으며, 반면, 채정한 정액 그대로 보관한 정자는 보관 온도에 관계없이 4 ~ 6일간만 정자의 운동성을 보존할 수 있었다.

본 실험결과로부터 범가자미 인공정장의 정자 냉장보존 효과가 더 우수함을 알 수 있었다.

냉장보존 능력이 향상된 범가자미 인공정장 개발

범가자미 정자의 냉장보존 효율을 높이기 위하여 범가자미 정자의 활력에 영향을 미칠 것으로 예상되는 인공정장의 구성 성분을 각각 달리 하여 조제한 후 24일간 정자를 냉장보존 할 수 있는 인공정장을 개발하였다.

정자의 운동성에 직접 영향을 미친다고 판단되는 NaCl, NaHCO<sub>3</sub>, KCl, CaCl<sub>2</sub> 중 어느 물질이 정자 보존(즉 정자를 운동하지 않게끔 하는지, 왜냐하면 정자는 어류 체외에서 가능하면 운동을 하지 않아야 오래 생존이 가능함)에 영향을 미치는지를 구명하기 위하여 NaCl을 첨가하지 않은 인공정장, NaHCO<sub>3</sub>을 첨가하지 않은 인공정장, KCl을 첨가하지 않은 인공정장, CaCl<sub>2</sub>를 첨가하지 않은 인공정장에 대하여 각각 앞서와 같은 방법으로 정장 냉장보존 실험을 수행하였다.

실험 결과 NaCl, NaHCO<sub>3</sub>을 각각 제거하여 조제한 인공정장의 정자 냉장보존능력은 전혀 없는 것으로 결과가 도출되었으며, KCl을 제거한 인공정장(도 2a 참조)과 CaCl<sub>2</sub> 제거한 인공정장(도 2b 참조)은 보존 능력이 일반 인공정장보다 매우 우수한 것으로 나타났다.

본 실험에서 CaCl<sub>2</sub>를 첨가하지 않은 범가자미 인공정장이 0℃, 2℃, 4℃ 모두 25일간 냉장보존 가능한 것으로 나타났으며, KCl을 첨가하지 않은 인공정장에서는 2℃의 냉장보존 효과가 가장 뛰어났다.

따라서, 범가자미 정자를 냉장보존하기에 가장 적합한 인공정장의 성분의 함량 및 최적 조성비(%) 그리고 반복된 실험에 의하여 얻어진 바람직한 조성범위는 아래의 표 3과 같다.

**표 3.**  
냉장보존성이 향상된 범가자미 인공정장 조성

	KCl	NaCl	MgCl <sub>2</sub>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	NaHCO <sub>3</sub>	Glucose	HEPES
량(mM/L)	4.75	102.36	7.12	0.7	7.0	2.8	10
조성비(%)	3.5	76.0	5.3	0.5	5.2	2.1	7.4
범위(%)	2.6~3.5	76.0~82.8	2.1~8.4	0.3~0.5	4.6~5.2	0.9~2.1	6.5~7.4

발명의 효과

이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 범가자미 인공정장은 정자의 냉장보존능력이 매우 뛰어나, 정자가 없어 인공수정을 시키지 못하고 있는 범가자미 종묘생산의 문제점을 해소할 수 있으며, 범가자미 수컷을 활어 상태로 운반할 필요 없이 정자만 간편하게 옮길 수 있는 경제적인 방법으로서 양식 산업의 발전에 크게 기여할 것으로 기대된다.

(57) 청구의 범위

**청구항 1.**  
삭제

**청구항 2.**  
삭제

**청구항 3.**

범가자미의 정액 중 정장의 이온조성  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  및 이들의 함량과 동일하도록 KCl, NaCl,  $CaCl_2$ ,  $MgCl_2$ ,  $NaH_2PO_4$ ,  $NaHCO_3$  및 Glucose를 포함하여 구성되는 물질을 혼합하여 얻어지고, 인공정장의 pH 조절을 위하여 HEPES를 포함하여, 상기 각 성분들의 함량은 mM/L 단위로 KCl은 4.75, NaCl은 102.36,  $CaCl_2$ 은 2.9,  $MgCl_2$ 은 7.12,  $NaH_2PO_4$ 은 0.7,  $NaHCO_3$ 은 7.0, Glucose는 2.0 및 HEPES는 10임을 특징으로 하는 범가자미 정자 냉장보존을 위한 인공정장.

**청구항 4.**

KCl, NaCl,  $MgCl_2$ ,  $NaH_2PO_4$ ,  $NaHCO_3$ , Glucose 및 HEPES를 포함하여 구성되며, 각 성분의 함량은 백분율로 KCl은 2.6~3.5, NaCl은 76.0~82.8,  $MgCl_2$ 은 2.1~8.4,  $NaH_2PO_4$ 은 0.3~0.5,  $NaHCO_3$ 은 4.6~5.2, Glucose는 0.9~2.1 및 HEPES는 6.5~7.4인 범가자미 정자 냉장보존을 위한 인공정장.

**청구항 5.**

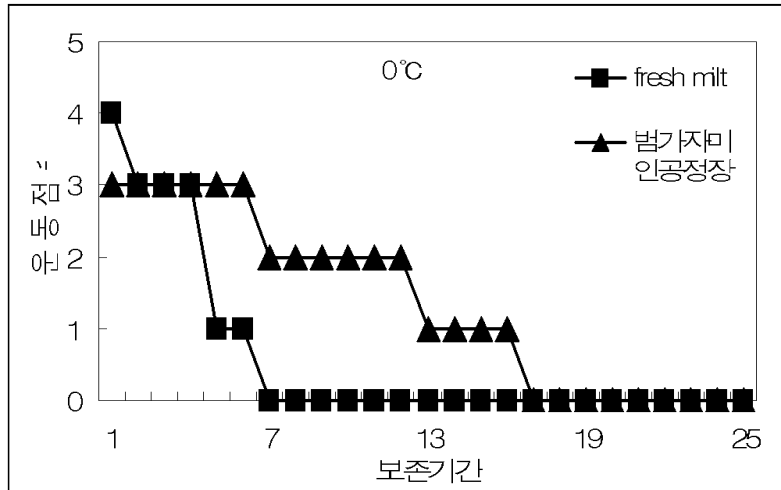
제4항에 있어서, 상기 인공정장은 정자의 냉장보존 기간이 적어도 3주 이상인 범가자미 정자 냉장보존을 위한 인공정장.

**청구항 6.**

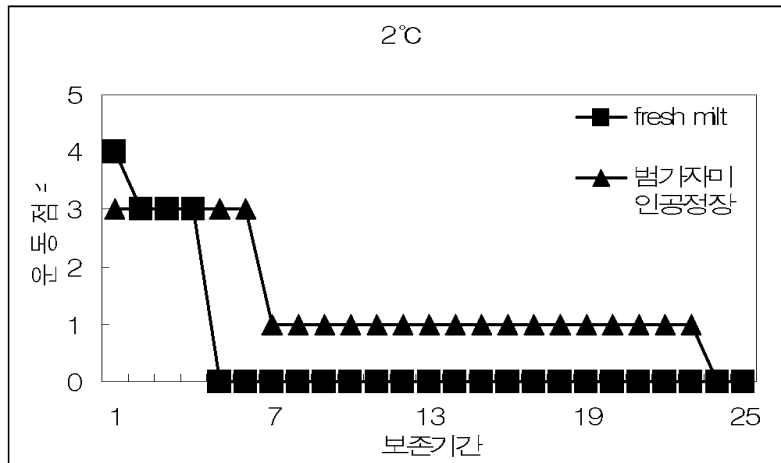
$CaCl_2$ , NaCl,  $MgCl_2$ ,  $NaH_2PO_4$ ,  $NaHCO_3$ , Glucose 및 HEPES를 포함하여 구성되며, 각 성분의 함량은 백분율로  $CaCl_2$ 은 2.6~3.5, NaCl은 76.0~82.8,  $MgCl_2$ 은 2.1~8.4,  $NaH_2PO_4$ 은 0.3~0.5,  $NaHCO_3$ 은 4.6~5.2, Glucose는 0.9~2.1 및 HEPES는 6.5~7.4인 범가자미 정자 냉장보존을 위한 인공정장.

도면

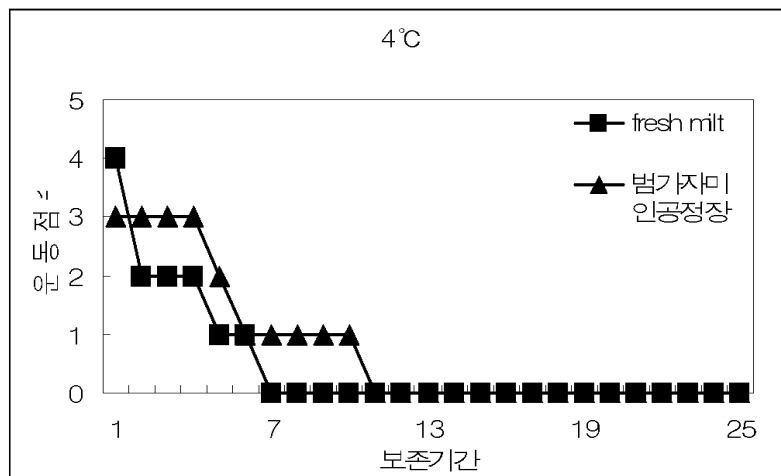
도면1a



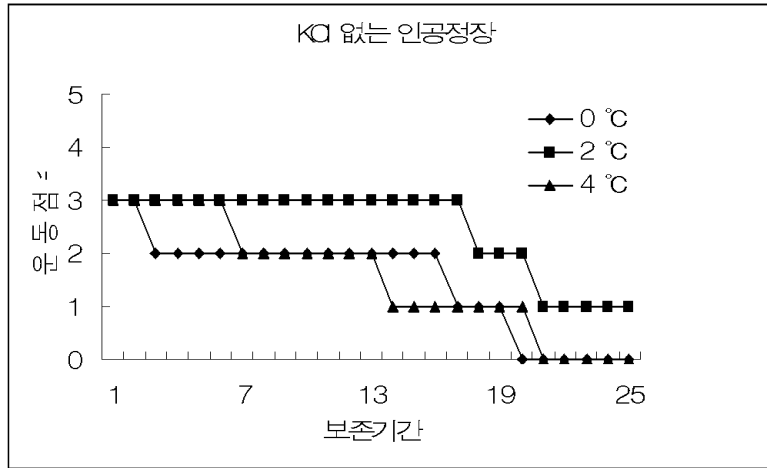
도면1b



도면1c



도면2a



도면2b

