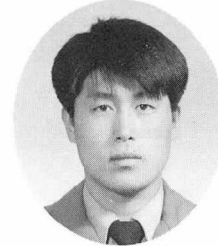


# 돼지동결정액 생산기술개발의 방향과 실제(II)



이 장 희 박사  
(축산기술연구소 종축개발부)

〈지난호 149쪽에 이어서〉

〈표 2〉에서는 일반적으로 동결정액제조시 필요한 기구 및 장비들이지만 특수동물의 경우에는 정액채취용 및 회석용 장비가 매우 달라진다. 그러나 경제적인 여건을 고려하여 고가장비 대신에 다소 번거로운이 발생하더라도 숙련에 의

해서 값싼 장비를 가지고도 손쉽게 처리할 수 있다.

예를들면 구태여 정자농도를 계산하기 위하여 광전비색계를 갖추지 않고 혈구계산판(Hemacytometer)을 이용한다든지 의빈대, 현미경, 항온

〈표 2〉 돼지에 있어서 동결정액 생산에 필요한 기구 및 장비

구 분	품 명	용 도	보조 기구 또는 장비	비 고
정액채취용	의빈대, 인공질 정액수집용기	정액채취 정액수용	인공질, 포피소독액, 위생복, 위생장갑 등	- 정액채취실에서 실시
정액검사용	현미경 슬라이드, 가온판 혈구계산판	정액성상 검사 정자활력유지 정자농도검사	슬라이드글라스, 커버글라스, 마이크로피펫, 광전비색계, 소독액 백금이, Hot-block	- 오염정도, 기형률 고려 - 직진정자수 고려
정액회석용	비이커, 시험관 회석용 피펫 항온수조 천평 pH meter 교반기	정액혼합용  정액온도 유지 시료 정량 산도 측정 정자/시료혼합	자동회석기, 크린벤치 B.O.D. 배양기 메스실린더 간이 pH meter Vortex mixer, 진탕기	- 정액 및 회석액을 반드시 등온에서 혼합  - 회석액의 pH - 정자/시료 균질
소독용	자불소독기	기구/초자소독	고압 또는 E.O 가스멸균기, 알콜소독분무기	- 경우에 따라 살균, 멸균선택
냉각	냉장고(5℃)	시료 냉각	비이커, 온도계, 자동세포동결기	- 냉각시간 고려 - 자동동결
포장	스트로우, 연속주입기	정액수용 용기 주입 및 봉입	자동포장기, 자동분주기 라벨기 등	- 정액에 개체 표시 - 정자수 고려
동결 및 보관	액체질소통 냉장고(5℃)	정액보관 온도유지	B.O.D. 배양기, 항온수조	- 예비동결 교반

\* 동결보존액 제조사 : 천평, 교반기, 삼각플라스크, 메스실린더, 비이커, pH meter, 기타 관련 기기의 약세사리 및 관련시약

수조 등은 정액채취, 검사 및 처리에 영향이 없을 정도의 규격만 갖춘 값싼 장비를 이용할 수도 있다. 다만 상업적인 정액생산을 위해서는 과학적이고도 신속하게 처리할 수 있는 자동화장비를 갖추는게 오히려 더 바람직하다. 돼지정액 채취 시 이용되는 의빈대는 상하조절이 가능하면 더욱 좋다.

그러나 모두의 경우에서도 생식기 질병의 전염방지를 위하여 최대한의 위생처리에 노력하여야 할 것이다. 또한 수태율 및 산자수에 전혀 영향이 없을 정도의 동결정액을 생산하여야 한다. 처리과정의 이론적 원리나 1회 수정에 필요한 최소 이상의 정자수는 반드시 맞추고 좀 더 많은 경험을 쌓으면 고가장비에 의존하지 않고서도 손쉽고 신속하게 동결정액제조가 가능해 진다.

## (2) 동결보존액에 관련된 시약

동결정액보존액은 정자의 생존에 알맞은 여러 가지 조건을 구비하여야 한다.

### (가) 수소이온농도(pH)

수소이온농도의 높고 낮음은 정자의 운동성과 생존성에 크게 영향을 미친다. 대부분의 효소 및 세포가 적절한 범위의 pH를 요구하는것과 마찬가지로 정자의 운동성과 생존성을 유지하기 위해서는 적절한 범위의 pH를 요구한다. 따라서 동결보존액의 pH는 원정액과 같거나 그 전후여야 한다. 이러한 완충효과를 증가시키고 pH를 조절하기 위한 시약으로는 주로 구연산염(sodium citrate), 인산염(sodium phosphate), 중탄산염(sodium bicarbonate) 및 주석산염(sodium tartarate) 등과 같은 염류와 트리스아미노메탄(trihydroxymethyl amino- methane), 구연산(citric acid) 및 아미노산(amono acid) 등과 같은 비전해질이 사용되며 이들은 보존액의 주성분이 되는 난황을 용해하는데도 중요한 역할을 한다.

### (나) 삼투압

동결보존액의 삼투압은 원정액과 같아야 한다. 보존액의 삼투압이 원정액보다 지나치게 낮거나 높으면 희석충격을 받아 기형정자가 많이 발생한다.

### (다) 전해질과 비전해질

보존액을 만들때 사용하는 전해질과 비전해질은 정자생존에 유해한것은 사용할 수가 없다. 전해질을 조정하기 위한 시약으로는 Na, K, Mg 및 Ca의 양이온이 사용되며, 비전해질로는 포도당(glucose), 과당(fructose) 및 젖당(lactose) 등의 당류가 첨가된다.

### (라) 정자의 보호물질과 영양물질

원정액은 외부로부터의 충격을 방지하거나 보호하는 물질이 거의 없거나 적어서 37°C의 적온에서도 오래살지 못한다. 따라서 보존액에는 보호물질과 영양물질을 첨가할 필요가 있다. 보호물질로는 난황, 우유, 탈지분유, 혈청, 난포액 및 orvus es paste(OEP) 등이 있으며 이러한 물질들은 저온충격 및 급냉으로부터 정자를 보호한다. 영양물질로는 당류를 첨가하는데 동결보존액에 첨가되는 당류로는 glucose, fructose, lactose, trehalose 및 raffinose 등이 있으며 이들 영양 및 보호물질들은 에너지원의 공급과 동해방지제 역할도 한다.

### (마) 동해방지제

보존액에 첨가되는 동해방지제는 글리세롤(glycerol), DMSO(dimethyl sulphoxide), ethylene glycol, propylene glycol, acetamide 및 각종 알콜 등의 침투성 동해방지제와 sucrose, glucose, lactose, trehalose, raffinose 등의 당류, polyvinylpyrrolidone, polyethylene glycol 및 고분자단백물질 등의 비침투성 동해방지제가 있다.

### (바) 세균억제제

정액중에 상당수의 세균이 정액채취과정이나 희석 및 제조과정에서 들어간다. 세균의 종류나 수는 동물종에 따라 다소 차이가 있을 수 있으나

이들 세균은 생존과 증식을 위해서 대사가질을 사용한 후에 대사산물을 축적하여(산소이용에 따른 pH변화) 정자의 생존기간을 단축할 뿐만 아니라 인공수정을 통하여 자궁내에 들어가 생식기 질병을 유발시킬 수 있다. 이들 세균의 증식을 억제하거나 없애기 위해서 1950년대까지는 설과제가 사용되었고 1990년대까지는 페니실린 및 스트렙토마이신이 주로 사용되었으나 항생제 내성에 따른 문제점때문에 최근에는 내성이 생기지 않았던 새로운 종류의 다양한 항생제가 이용되고 있다.

정액에서 주로 발견되는 세균들로는 Staphylococcus spp., Pseudomonas spp., Escherichia spp., Klebsiella spp., Citrobacter spp., Micrococcus spp., Eubacterium 및 Eubacterium suit 등이 있으며 이들 병원체에 대한 항생제로는 Gentamicin, Lincomycin, Neomycin, Polymixin B, Spectinomycin 및 Kanamycin 등이 주로 사용되고 있으나 최근에는 Amikacin, Bacitracin, Colistin, Dibekacin, Erthromycin, Tylosin 및 Sulfadiazine 등도 사용되어지고 있다<표 3>.

(사) 정자의 수정능획득 유기물질

최근에 체외수정기술의 발달로 정자의 수정을 또는 수태율을 향상시키기 위하여 여러가지 화학제 또는 생체활성물질들이 이용되어지고 있다.

이들 정자의 수정능획득 유기물질로는 heparin, caffeine, calcium ionophore 및 이들의 병용 처리와 PAF(platelet activating factor), BSA(bovine serum albumin), 난포액 등의 생체활성물질들도 이용되어지고 있다.

다. 돼지 동결정액보존액의 조성

축종별 동결정액 보존액의 조성분은 대개 유사하나 소, 돼지 등의 일반가축외에는 크게 개발되어 있지 않다. 최근에 이용되는 돼지정액동결

<표 3> 돼지정액에서 발견되어지는 병원체 및 사용되어지는 항생제

정액에서 발견되는 미생물	빈번히 발견되는 것 • Staphylococcus spp. • Pseudomonas spp. • Escherichia spp. • Klebsiella spp. • Citrobacter spp. • Micrococcus spp. • Eubacterium suis	가끔 발견되는 것 • Corynebacterium spp. • Streptococcus spp. • Proteus spp. • Serratia spp. • Bacillus spp. • Enterobacter spp. • Aerobacter spp. • Bordetella spp. • Mycoplasma spp.
정액에서 사용되는 항생제	상 용 • Dihydrostreptomycin • Gentamicin • Lincomycin • Neomycin • Penicillin • Polymixin B • Spectinomycin	대 용 • Amikacin • Bacitracin • Chlortetracycline • Colistin • Dibekacin • Enrofloxacin • Erythromycin • Kanamycin • Sulfanilamide • Sulfadiazine • Tylosin

정액에서 발견되는 바이러스	• Adenovirus • African swine fever* • Aujeszky's disease (Pseudorabies) virus • Cytomegalovirus • Enteroviruses • Foot-and-mouth disease	• Hog cholera • Japanese encephalitis • Porcine parvovirus* • Porcine reproductive respiratory syndrome (PRRS)* • Reovirus	• Swine vesicular disease • Transmissible genital papilloma * Transmitted through semen
----------------	---	--	---

보존액 및 액상정액희석액의 조성은 <표 4> 및 <표 5>와 같으며 융해액의 조성은 <표 6>과 같다.

그 외 지금까지 사용되어져 왔던 동결보존액으로는 BTS, BF-5, TesNaK, TEST, Glucose-Yolk, Hulsenberg 등이 있으며 액상정액희석액으로는 Guelph, Zorpva 및 Reading 등이 있다. 스트로우 동결정액제조시 상업적으로 가장 널리 사용되는 보존액으로는 Lactose-Yolk 희석액이며 이의 조성분은 Lactose hydrate 11g 및 Egg yolk 25ml에 100ml 증류수를 첨가하고(1차희석액) 2

차희석액은 1차희석액에 glycerol 10% (v/v) 및 OEP 1.5% (v/v)를 첨가한다.

〈표 4〉 돼지정액 동결보존액의 조성분(이 등, 1994. 한국수정란이식학회지)

I 차 희석액	
Tes-N-Tris(hydroxyl methyl)methyl 2 aminomethane sulfonic acid(Sigma) .....	1.2g
Tris(hydroxyl methyl) aminomethane .....	0.4g
Glucose .....	3.0g
Sodium lauryl sulfate(항동해방지제) .....	0.16g
Penicillin G(항생제) .....	(250-1000IU/ml)
Streptomycin sulfate(항생제) .....	0.1g
Catalase(효소제) .....	159IU/ml
위 시약을 증류수 100ml에 용해(pH 7.4 ; 1N NaOH로 조정)후 20ml를 제거하고 난황을 20ml 첨가하여 충분히 균질한 다음 3,000rpm에서 15분간 원심 분리후 상층액만 사용.	
II 차 희석액	
1차 희석액에 glycerol 2% (v/v)를 첨가 시킨것(5°C에 보관할 것). 이때 glycerol 4-8% (최종농도 2-4%) 첨가도 무방하며, glycerol 입자를 충분히 균질화 시킬것.	

\* BSA(10mg/100ml), pig follicular fluid(10%) 및 OEP(1.5%) 첨가 고려

\* 항생제는 내성관계로 Linco-spectomycin, antibiotics로 대체 고려

### 라. 정액채취방법

가축 또는 경제동물의 정액을 채취하기 위한 방법으로는 여러가지가 고안되어 있으며 이들의 방법은 인공수정기술의 발달과 더불어 변천, 실용적으로 개선되어 왔다. 현재 정액의 채취방법은 인공질법, 전기자극법, 맛사지법 및 정소상체

〈표 6〉 돼지 동결정액 용해액의 조성분

Dextrose, anhydrous(무수 포도당) .....	3.10g
Sodium citrate, dihydrate(구연산 나트륨) .....	0.60g
Sodium bicarbonate(제2탄산나트륨) .....	0.125g
EDTA .....	0.125g
(disodium ethylenediamine tetraacetate)	
Potassium chloride .....	0.75g
Caffeine .....	13.5mg
또는 caffeine sodium benzoate .....	
	27.0mg
Penicillin G Potassium .....	250IU/ml
(Hostacillin ; 한독약품) .....	
	(3.1mg)
Streptomycin sulfate, dihydrate .....	100.0mg
(황산스트렙토마이신)	
..... per 100ml distilled water(증류수)에 용해	

〈표 5〉 돼지 액상정액에 이용되는 희석액의 종류와 조성분

조성분 \ 종류	Kiev	BTS	IVTmod.	Zorlesco	Modena	Butschwil	MR-A	BW25	Androhep
Glucose									
monohydrate	60.0		3.0	11.5	27.5	35.0	+	11.5	26.0
anhydros		37.0							
Sodium citrate	3.7	6.0	24.28	11.65	6.9	6.9	+	15.9	8.0
Sodium bicarb.	1.2	1.25	2.4	1.75	1.0	1.0	+	1.2	1.2
EDTA, disodium	3.7	1.25	-	2.35	2.35	2.35	+	2.4	2.4
KCl	-	0.75	0.3	-	-	-	-	-	-
K-acetate	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Tris, buffer	-	-	-	6.5	5.65	5.65	-	-	-
Citric acid	-	-	-	4.1	2.9	3.15	-	-	-
Cystein	-	-	-	0.07	-	0.054	+	-	-
BSA(Serva 11930)	-	-	-	5.0	-	3.0	+	2.5	2.5
MOPS	-	-	-	-	-	-	+	10.5	-
HEPES	-	-	-	-	-	-	-	-	9.5
mosm	380	330	290	240	240	284	290	312	309
pH	7.2	7.2					6.9	6.6	6.8

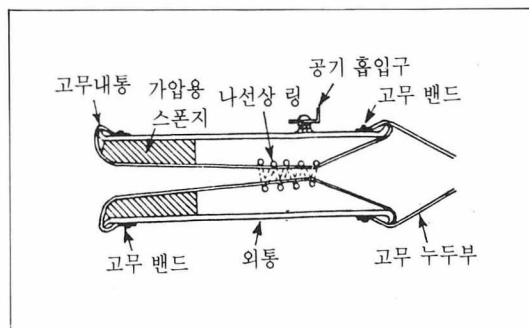
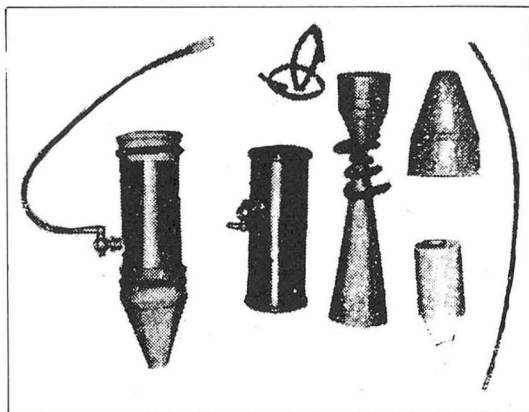
정자 회수법 등으로 다양하며 축종별로 이용되는 방법은 <표 7>과 같다.

이들중 인공질법은 자연에 가장 가까운 상태로 정액을 채취할 수 있기 때문에 각종 동물중에서도 사정시간이 짧은 초식동물에 보편적으로 이용되는 방법이며 전기자극법과 맛사지법은 인공질로서 곤란한 경우에 사용하나 강제적으로 정액을 채취할 수 있는 장점도 있다.

특히 최근에는 체외수정기술의 발달로 실험동물 또는 상시 정액이 필요한 동물의 경우에는 도살후 정소상체미부정자를 회수하여 사용한다. 산양, 돼지 및 대동물의 경우 정소상체미부관에 카테타를 연결하여 도살하지 않고도 상시 정자를 회수 할 수 있는 수술법도 최근에 소개된 바 있다.

### (1) 인공질법

인공질의 원리는 동종 자성생식기가 갖는 자극적 요인을 인공적으로 그에 가깝도록하고 음경의 접촉부는 유연하고 점활성이 있으며 압력과 온도의 조절에 의해서 음경에 분포되어 있는 말초신경을 자극, 흥분케 하는 것이다. 즉 인공질은 경질고무나 금속 또는 플라스틱제의 외통과 부드러운 고무제의 내통으로 구성하여 내.외통사이에 온수 또는 보온성이 양호하고 전해질이 포함된 유성물질(소금물 및 식용유 등의 혼합액: 전기적으로 가온시킬 경우) 및 공기를 넣어 온도와 압력을 조절하는 것이다. 인공질법은 주로 사정시간이 짧은 말, 소, 산.면양 및 토끼 등의 초식동



<그림 3> 돼지에서 사용되어지는 인공질

물에 많이 이용되며 돼지에 이용되는 인공질은 <그림 3>와 같다. <다음호에 계속>

<표 7> 동물중에 따른 정액채취방법

동물명	채 취 방 법
소	인공질법, 전기자극법, 정소상체정자회수법
말	인공질법
면 · 산 양	전기자극법, 인공질법
돼 지	수압법, 인공질법, 정소상체정자회수법
토 끼	인공질법, 전기자극법
닭(조 류)	복부맛사지법
개	음경맛사지법, 인공질 및 전기자극법
실험 동물	도살후 정소상체 미부정자회수법

