

돼지 인공수정용 국산 희석액 KpA의 효용성에 관한 연구 : 보존온도와 pH변화 측면

정구민 · 김선의 · 신영수* · 김인철** · 이장희** · 임경순***
한국생명과학연구소

A Study on Efficiency of Boar Semen Extender KpA for Swine AI: Aspects of Storage Temperature and pH Change

Chung, K. M., S. E. Kim, Y. S. Shin*, I. C. Kim**, J. H. Lee** and K. S. Im***
Hankook Life-Science Institute

ABSTRACT

This study was carried out to evaluate the effect of pH and storage temperature on the viability of boar sperm diluted with extender KpA for swine artificial insemination. The results obtained in this experiment were summarized as follows :

1. The viability of boar sperm diluted with KpA was higher than that with BTS during storage and especially more than 60% of sperm viability in KpA was maintained through 6 days. The pH values of all extenders were kept during storage of semens following dilution.
2. The sperm diluted with acidic (pH 6.3~6.8) or alkalic (pH 7.8~8.0) KpA and stored at 4℃ or 37℃ were more sensitive in viability than that with neutral pH (6.8~7.3) and at 17℃ storage. But pH values of all conditions were not increased rapidly. Especially acidic and alkalic diluents were more stable in pH after dilution.

Conclusively, extender pH and storage temperature was the important factors for sperm viability. The KpA setting up around neutral pH was the optimal boar semen extender for maintaining liquid semen at 17℃.

(Key words : KpA, Extender, pH, Boar semen, Sperm viability)

I. 서 론

1980년대 후반부터 실용화되기 시작한 액상정액을 이용한 돼지 인공수정은 1997년 현재 국내 전체 종빈돈의 58.0%에 실시되었고 점차 유럽 수준인 70~

75% (박, 1998) 수준으로 확대되어 나갈 전망이다. 이에 반해 액상정액 희석액은 대부분 수입에 의존하고 있어 막대한 외화 낭비를 초래하며, 지금까지 국내에서 개발된 희석제가 실용화 된 예는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구는 독자개발한 돼지인공수정용 희석

* 신구대학교 자원동물산업과 (Dept. of Animal Science, Shin-Gu College)

** 축산기술연구소 종축개발부 (National Livestock Research Institute)

*** 서울대학교 농업생명과학대학 동물자원과학과 (Dept. of Animal Science & Technology, College of Agriculture and Life Science, Seoul National University)

액 KpA를 실용화 하기 위해서 온도와 pH변화가 KpA의 정자 보존능력에 미치는 영향을 알아 보고자 실시하였다. 회석액 KpA는 동결정자를 이용하여 개발한 Kp(김 등, 1998)를 신선정액에 적합하도록 몇가지 성분을 조정 한 것이다. 실험 1은 KpA 회석정액을 17℃에 보존하면서 정자의 생존성과 pH변화를 알아 보았으며, 실험 2는 실험 1에서 나타난 안정된 결과가 KpA의 pH와 보존온도를 인위적으로 변화시켰을 때 정자의 생존성에 미치는 영향을 살펴보고자 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 설계

1) 실험 1. 회석액과 회석정액의 보존 중 pH변화와 정자의 생존성 변화

실험 1은 요크셔 계통의 종용돈에서 채취한 신선정액을 KpA와 BTS로 회석한 후 17℃ 보관고(Cason, 한국)에 1주일간 보존하면서 정자의 생존성과 회석정액의 pH변화를 조사하였다. 또 회석액 자체를 17℃에서 보존하면서 pH변화를 조사하였다.

2) 실험 2. 회석액의 pH와 보존온도의 인위적인 변화가 따른 회석정자의 생존성에 미치는 영향

실험 2는 KpA의 초기pH를 약산성(6.0~6.3), 중성(6.8~7.3), 약염기성(7.8~8.0)으로 조정 한 다음 신선정액과 회석하였고, 이들을 각각 4℃, 17℃ 및 37℃에서 24시간까지 보존하면서 회석정액의 pH변화와 정자의 생존성을 조사하였다.

2. 돼지인공수정용 회석액의 제조

회석액 KpA는 sodium bicarbonate, glucose, cystein, trisodium citrate의 첨가량을 극소화시켰으며 pH를 유지하기 위해서 EDTA, tris 및 citrate와 같은 완충제를 첨가하여 제조하였으며, 실험목적에 따라 1N HCl과 1N NaOH를 첨가하여 pH를 6.0~6.3, 6.8~7.3, 7.8~8.0의 세 범위로 조정하였다. 한편 BTS는 Pursel과 Johnson (1975)의 조성에 따라 제조하였다. 각각의 회석제 분말은 Milli-Q PF+ water(Millipore, 미국)에 녹여, 0.22 μ m Millipore mic-

ro-fliter로 여과하여 실험에 사용하였다.

3. 정자의 준비와 생존성 및 pH 검사

요크셔 계통의 종용돈에서 채취한 신선정액(축산연 종축개량부)은 채취 직후 각각의 회석액과 1:1로 섞은 후 약 1~2시간 동안 3~4회에 걸쳐 정자의 최종농도가 3.75 \times 10⁶/ml가 되도록 회석하였다. 각 회석정액은 4℃, 17℃, 37℃의 돼지액상정액보관고(Cason, 한국)에서 보존하면서 2시간 간격으로 이후 24시간 동안 회석정액 중 일부(10 μ l)를 혈구계산판에 적하하여 37℃로 가온 후 광학현미경(200 \times , 400 \times)에서 정자의 생존성을 관찰하였다. 생존한 정자의 비율은 백분율로 산정하였다. 한편 pH는 회석정액의 일부(2ml)를 덜어 pH측정기(Fisher, 미국)를 이용하여 2회 이상 측정 한 값을 평균하여 산정하였다.

4. 통계처리

모든 실험은 3반복 이상 실시하였으며 실험당일을 Day0로 하였다. 정자의 생존율은 SAS institute software package (SAS institute Inc., 1985)를 이용하여 Duncan's Multiple Range Test로 유의성 검정을 실시하였다.

III. 결 과

1. 실험 1. 회석액과 회석정액의 보존중 pH와 정자의 생존성 변화

KpA와 BTS 회석액을 17℃에서 6일 동안 보존 한 결과 pH의 변화는 Fig. 1과 같다. 제조 당일의 pH는 두 회석액 모두 6.7~6.8 범위였으며, 보존 5일째까지 7.1~7.3 범위로 안정되었다.

신선정액을 회석액 KpA와 BTS로 회석한 후 17℃ 보관고에서 7일 동안 보존한 결과 KpA 회석정액은 BTS회석정액보다 보존기간 동안 높은 생존성을 나타냈으며, 보존 5일까지 60%이상의 생존율을 유지하였다 (Table 1).

또한 KpA와 BTS로 회석한 회석정액의 pH 변화는 5일째까지 KpA에서는 6.86~7.06, BTS에서는 6.88~7.15로서 비교적 안정하였다 (Fig. 2). 그러나 3일 이후 BTS가 KpA 보다 pH가 다소 증가하였다.

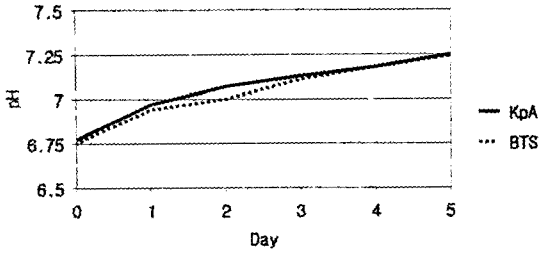


Fig. 1. Serial pH change of boar semen extenders at 17°C chamber.

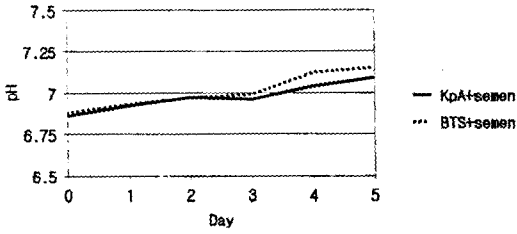


Fig. 2. Serial pH change of boar semen diluted with extender KpA and BTS at 17°C chamber.

2. 실험 2. 회석액의 pH와 보존온도의 변화에 따른 pH와 회석정자의 생존성 변화

산성(6.0~6.3), 중성(6.8~7.3), 염기성(7.8~8.0)의 KpA 회석정액을 각각 4°C, 17°C 및 37°C에 보존한 결과 정자의 생존성과 회석정액의 pH변화는 Table 2, Fig. 3과 같다.

산성(pH 6.0~6.3)의 KpA에 희석한 경우 정자의 생존율은 모든 온도 범위에서 낮았으며, 4°C와 37°C의

경우 2시간 경과부터 급격히 떨어졌다. 중성 회석정액(pH 6.8~7.3)내 정자의 생존율은 다른 경우보다 전체적으로 높았으나, 4°C와 37°C 보존시 6시간 경과후 급격히 낮아졌다. 한편 염기성 회석정액(pH 7.8~8.0)의 경우는 산성에 비해 완만한 생존율 저하를 보였으며 4°C와 37°C에서 처음 2시간까지는 17°C와 큰 차이가 없었다. 특히 6시간까지의 생존율은 산성, 중성 회석정액에서와 달리 4°C(60.0%)에 보존한 경우가 37°C(55.0%)에서 보존한 경우보다 더 높게 나타났다(Table 2).

회석정액의 pH는 모든 경우에서 급격한 증감은 나타나지 않았으며 중성 회석정액의 pH는 24시간 동안 생리적인 범위내에 있었다. 그러나 중성 회석정액의 24시간 후 pH 증가폭(0.21~0.23)은 산성(0.01~0.06) 혹은 염기성(-0.19~0.07)의 경우 보다 더 높았으며, 특히 염기성 회석정액의 경우 6시간까지는 pH가 증가하였으나 24시간째에는 초기 pH보다도 더 낮게 나타났다.

IV. 고찰

돼지인공수정용 회석액 KpA는 신선정액과 희석한 후에도 생리적인 범위(6.8~7.5)에서 유지되도록 초기 pH 조정에 유의하였으며 본 연구결과 KpA 회석

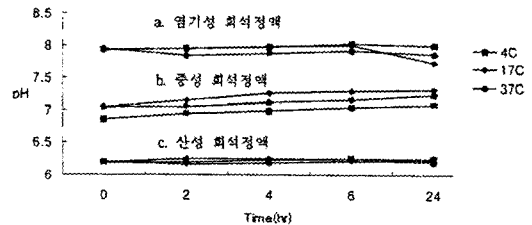


Fig. 3. Effect of storage temperature and pH of extender KpA on serial pH change of boar semen diluted with KpA.

Table 1. Viability of boar sperm diluted with extender KpA and BTS at 17°C chamber

Diluted boar semen	Storage days of diluted boar semen							
	0*	1*	2*	3*	4*	5*	6	7
KpA+semen	82.8±1.83	80.5±1.89	77.5±2.14	68.2±3.17	65.0±4.08	61.7±3.33	58.3±2.18	55.0±2.24
BTS+semen	78.5±1.82	75.3±2.91	71.2±2.24	61.5±3.45	55.3±2.33	50.8±2.39	48.3±3.07	45.8±3.52

* P>0.05

Table 2. Effect of storage temperature and pH of extender KpA on boar sperm viability

Initial pH of extender	Storage temp. ($^{\circ}$ C)	Time(hr)				
		0	2	4	6	24
6.0~6.3	4	50.0	40.0	17.5	13.8	12.5
	17	62.5	52.5	36.3	34.5	20.0
	37	50.0	33.8	17.5	13.3	0.0
6.8~7.3	4	69.5	57.5	56.3	48.8	31.3
	17	73.3	70.8	63.8	60.8	53.8
	37	69.5	59.5	55.0	52.0	4.8
7.8~8.0	4	76.3	63.3	60.0	48.8	19.5
	17	73.8	71.3	70.8	53.8	40.0
	37	73.8	65.8	55.0	36.3	2.0

액 단독 (6.77~7.25) 혹은 정액과 회석한 (6.86~7.09) 두 경우 모두 보존기간 6일 동안 안정된 pH를 유지하였다. 또한 KpA 회석정자의 보존 중 생존율은 5일째까지 60%이상으로 나타났으며 정자의 생존성 측면에서 KpA는 BTS 보다 돼지 신선정액의 보존에 더 우수하다는 것을 알 수 있었다.

산성 회석정액(pH 6.0~6.5)에서의 정자의 급격한 생존성 감소는 정자 세포내부의 산성화로 인한 정자의 부동화 (Carr 등, 1985)가 원인인 것으로 생각되며 Meizel과 Deamer (1978)는 침체내부의 산성화가 침체효소의 활성화를 방해하여 정상적인 침체반응을 일으키지 못한다고 보고한 바 있다.

중성의 환경 (pH 6.8~7.3)에서 회석정자의 생존율은 보존 온도에 영향을 많이 받는 것으로 나타났는데, 특히 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 후의 낮은 생존율은 고온에서의 많은 에너지 소모로 인한 결과로 사료된다. 돼지의 정자는 타가축과는 달리 15 $^{\circ}$ C 이하에서 저온충격을 받는데 (Leeuw 등, 1990; Parks와 Lynch, 1992; Althouse 등, 1998), 저온으로 인한 정자의 원형질막 손상은 세포막의 선택적 투과기능을 잃게 하여 결국 세포는 사멸하는 것으로 알려져 있다(Leeuw 등, 1991; Robertson 등, 1990; Watson, 1996). 본 실험에서도 17 $^{\circ}$ C에 비하여 4 $^{\circ}$ C 보존시 정자의 생존율이 유의하게 낮았는데 이는 본 실험에 사용한 KpA에 4~5 $^{\circ}$ C 보존시 세포막 손상을 최소화하는 Lactose, 난황, Glycerol, BSA, BHT 등 (Kikuchi 등, 1998; 박 등, 1996; Bamba와 Cran, 1992)의 성분이 포함되지 않았기 때문인 것 같다.

회석정액이 염기성화 (pH 7.8-8.0)된 경우 4 $^{\circ}$ C와 37 $^{\circ}$ C에서 처음 2시간까지는 17 $^{\circ}$ C와 생존율에서 큰 차이가 없었으며, 특히 6시간까지 4 $^{\circ}$ C에서의 생존율은 37 $^{\circ}$ C보다 더 높은 경향을 보였다. 생리적인 수준보다 높은 pH는 정자의 수정능 획득시간을 단축시키며 침체 내부의 pH 상승으로 인해 침체반응이 유도된다고 알려져 있다 (Cherr, 1985; Hyne와 Garber, 1981; 박과 임, 1991; Hyne, 1984). 본 연구 결과 염기성 회석정자의 초기의 높은 생존율은 수정능 획득과 침체반응 등의 일련의 정자생리적인 변화에 따른 것이며 이로 인한 많은 에너지 소모가 24시간 후의 급격한 생존성 저하의 원인이 된 것으로 생각된다. 특히 고온의 환경 (37 $^{\circ}$ C)은 정자의 이러한 변화를 더욱 가속화 한 것 같다.

회석정액의 pH 증가는 보존온도와는 유의한 상관관계가 없으나 회석정액의 초기 pH에 따라서는 각각 다른 결과를 보여주고 있다. 본 실험에서는 회석액의 초기 pH를 조정하기 위하여 1N HCl과 1N NaOH를 첨가하였는데 이것이 중성에 비하여 산성과 염기성 환경에서 pH변화폭이 적게 나타난 원인으로 생각된다. 또한 회석정액의 pH 변화는 정자의 생존율과도 밀접한 관련이 있는데, 특히 염기성 회석정액의 경우 6시간까지는 다른 경우와 마찬가지로 pH가 증가하였으나 생존율이 급감한 24시간째는 처음의 pH보다도 더 낮아졌으며 이는 다수의 정자가 동시에 사멸하면서 발생한 과도한 산성 성분의 영향으로 사료된다.

본 연구결과 돼지인공수정용 회석액 KpA는 정자의 생존성 측면에서 BTS 보다 우수한 15~18 $^{\circ}$ C 보존용

돼지액상정액 회석액임을 확인하였고, 정자의 생존율을 높게 유지하기 위해서는 회석액의 pH와 보존온도의 조화가 중요하다는 사실을 알 수 있었다. 그러나 KpA의 우수성을 입증하고 실용화하기 위해서는 정자 세포 수준의 변화, 인공수정 후 산자수 비교 등의 추가 연구가 필요하며 현재 진행 중에 있다.

V. 요약

본 연구는 독자개발한 돼지인공수정용 회석액 KpA를 실용화하기 위하여 온도와 pH변화가 KpA의 정자 보존능력에 미치는 영향을 알아보고자 실시하였다. 요크셔 계통의 중용돈에서 채취한 신선정액을 KpA와 BTS으로 회석한 다음 17℃에 1주일간 보존하면서 생존율과 pH변화폭을 조사한 결과 KpA 회석정액은 BTS 회석정액보다 보존기간 동안에 높은 생존성을 나타내었으며, 5일까지 60% 이상의 생존율을 유지하였다. 또한 두 회석액과 회석정액 모두 보존 중 생리적인 pH 범위내에서 안정하였다.

회석액 KpA의 pH를 산성 (pH 6.3~6.8), 중성 (pH 6.8~7.3), 염기성화 (pH 7.8~8.0)으로 조정한 다음 신선정액과 회석하여 4℃, 17℃ 및 37℃에서 보존한 결과 회석정액의 pH는 급격한 변화 없이 안정하였으나 중성에서 보다 산성과 염기성의 환경에서 더 완만한 변화를 보였다. 또한 회석액을 산성화 또는 염기성화 하였을 때 정자가 받는 스트레스는 17℃보다 4℃와 37℃에서 더욱 현저히 나타났다.

따라서 KpA는 17℃ 보존에 적합한 회석액이며, 보존 중 정자의 생존율을 높게 유지하기 위해서는 회석정액의 pH와 보존온도의 조화가 중요한 역할을 한다는 사실을 알 수 있었다.

VI. 인용문헌

1. Althouse, G. C., M. E. Wilson, C. Kuster and M. Parsley. 1998. Characterization of lower temperature storage limitations of fresh-extended porcine semen. *Theriogenology* 50:535-543.
2. Bamba, K and D. G. Cran. 1992. Effects of treatment with butylated hydroxytoluene on the susceptibility of boar spermatozoa to cold stress and dilution. *J. Reprod. Fert.* 95:69-77.
3. Carr, D. W., M. C. Usselman and T. S. Acott. 1985. Effects of pH, lactate viscoelastic drag on sperm motility. *Biol. Reprod.* 33 : 588-595.
4. Cherr, G. N. 1985. Gamete motphology, physiology and interaction in the white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. *A. B. A.* 53:844.
5. de Leeuw FE, B. Colenbrander and A. J. Verkleij. 1991. The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. *Proc. Boar Semen Pre II.* 1:95-104.
6. de Leeuw FE, H. C. Chen, B. Colenbrander, et al. 1990. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology* 27:171-183.
7. Hyne, R. V. 1984. A bicarbonate and calcium induction of rapid guinea-pig sperm acrosome reactions by monovalent ionophores. *A. B. A.* 53:416.
8. Hyne, V. R. and D. L. garbers. 1981. Requirement of serum factors for capacitation and the acrosome reaction of guinea pig spermatozoa in buffered medium below pH 7.8. *Biol. Reprod.* 24:257-266.
9. Kikuchi, K., T. Nagai, N. Kashiwazaki, H. Ikeda, J. Noguchi, A. Shimada, E. Soly and H. Kaneko. 1998. Cryopreservation and ensuing in vitro fertilization ability of boar spermatozoa from epididymides stored at 4℃. *Theriogenology* 50:615-623.
10. Meizel, S. and D. W. Deamer. 1978. The pH of the hamster sperm acrosome. *J. Histo. Cyto.* 26 : 98-105.
11. Parks J. E. and D. V., Lynch. 1992. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. *Cryobiology* 29:255-266.

12. Pursel, V. G. and L. A. Johnson. 1975. Freezing of boar spermatozoa : freezing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J. Anim. Sci.* 40:99.
13. Robertson L., J. L. Bailey and M. M. Buhr. 1990. Effects of cold shock and phospholipase A2 on intact boar spermatozoa and sperm head plasma membranes. *mol. Reprod. Dev.* 26:143-149.
14. Watson, P. F. 1996. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. *Reprod. Dom. Anim.* 31:135-140.
15. 김선의, 정구민, 서동삼, 김득중, 김인철, 김현중, 신영수, 임경순. 1998. 돼지인공수정용 정액액상 보존제 Kp의 개발에 관한 연구 I. Kp의 pH조절과 냉동정자에 의한 보존성 검정. *한국가축번식학회지* 22(4):405-410.
16. 박영식, 임경순. 1991. pH자극이 소 정자의 침모 반응에 미치는 영향. 1991. *한국가축번식학회지* 15(3):195-199.
17. 박창식, 김민규, 이성호, Z. Xu, C. Z. Lee and Y. H. Lee. 1997. 조절되지 않은 실온에서의 돼지액상정액 보존에 관한 연구. *한국가축번식학회지* 21(1):25-30.
18. 박창식, 천용민, Z. Xu. 1996. 돼지 액상정액 보존을 위한 Lactose-Egg Yolk와 B tschwiler 희석액의 비교. *한국가축번식학회지* 20(2):101-109.
19. 박창식. 1998. 한국의 돼지 인공수정 현황과 문제점. *한국가축번식학회지* 22(3) 별책 pp. 15-31. (접수일자 : 1999. 5. 4. /채택일자 : 1999. 5. 22.)