

한우의 생식세포 보존에 관한 연구

I. 한우 정액의 일반성상 및 동결후 생존성에 미치는 영향

이명식[†] · 박정준 · 전기준 · 정영훈 · 우제석 · 박수봉 · 임석기 · 연성흠
· 손동수 · 나기준 · 강만종¹ · 문승주¹
농촌진흥청 축산기술연구소

Studies on Preservation of Germ Cells in Hanwoo

I. Effects of Frozen Thawed Viability and Characteristics in Bovine Semen

M. S. Lee[†], J. J. Park, G. J. Jeon, Y. H. Jung, J. S. Woo, S. B. Park, S. K. Im,
S. H. Yeon, D. S. Son, G. J. Na, M. J. Kang¹ and S. J. Moon¹

National Livestock Research Institute, R.D.A.

SUMMARY

This study was carried out to cryopreserve and to investigate characteristics of semen in Hanwoo. Semen was obtained from bulls selected by Daekwanryeong Branch station. Semen was collected each morning of the experiment, placed in water jacketed tubes at 37°C, and transported to the research laboratory within 10 minutes. Semen was extended with Egg yolk-glycerol extender to contain 50×10^6 sperm/ml. Semen was cooled over a 6h period in water jacketed tubes from about 25 to 5°C, Egg yolk-glycerol extender was added in one step at 5°C. Semen was aspirated into 0.5ml straws, which were sealed with powder. Egg yolk-glycerol extender, which is used in Hanwoo sperm frozen and stored, semen from 13 Hanwoo bulls collected, the postthawed percentages of motile sperm were 65.7%. In semen characteristics of Hanwoo bulls, number of bulls volume are 5.7 ml and total cell count are 975×10^6 /ml ejaculate.

(Key words : Hanwoo, bull, semen, characteristics, cryopreservation, egg yolk-tris extenders)

서 론

육우의 수소에서 최초 채정은 9.3개월경에 가능하고 활동성 있는 정자는 10.2개월이 지나서 출현되며 수소의 춘기발동기는 10.3개월경이고, 이때의 체중은 225kg이었다. 성장단계별 채정량은 11.6개월에 4ml, 14개월에 5.4ml, 19.1개월에 8.5ml, 26.6개월에 9.5ml, 34.5개월에 10.6ml로 증가됨을

보고하였다(Johnson 등, 1971). 또한 Ruttle 등(1975)은 계절요인이 채정량에 영향을 미치며 봄에 3.32ml로 가장 많으며 겨울에는 2.26ml로 가장 적었다고 하였으며, Furman 등(1975)은 2세의 헤어포드종 500kg 내외의 종모우를 공시하여 매주 1회씩 채정하였고 매회 동일한 조건의 전기자극법으로 정액을 채취하였으며, 5분 간격으로 2회 채정을 실시한 결과 채정량이 1회차에 7.95ml, 2회차에 9.5

본 연구는 농촌진흥청 대형공동연구사업 연구과제로 수행되었음.

¹ 전남대학교(Chonnam University)

[†] Correspondence : E-mail : leems423@rda.go.kr

ml로 증가하는 경향이었으며, pH도 7.4로 다소 높아지는 경향을 보고하였다. 전기자극의 길이와 빈도는 분당 50~60 pulses에서 사정이 원활히 이루어졌으며, 정자농후액에서의 정자 농도는 1차 사정액에서 $596 \times 10^6/\text{ml}$ 로 나타났고, 2차 사정액에서는 $334 \times 10^6/\text{ml}$ 로 나타났다. 또한 정자농후액에서 전진운동의 활력을 가진 정자의 출현율은 1차 사정액에서 52.9%였고, 2차 사정액에서 59.1%로 나타났음을 보고한 바 있다. 헤어포드종에서 인공질을 이용하여 3차 가승가를 실시한 후 채정한 결과, 17두의 수소에서 평균 춘기발동기는 44 ± 1 주령이었고 이때 체중은 $321 \pm 12\text{kg}$ 이었으며, 2세가 되었을 때 평균 체중은 $660 \pm 11\text{kg}$ 에 도달하였고 사정량과 총 정자수는 수소가 연령이 증가함에 따라 두드러지게 증가하였다(Almquist 등, 1967). 정자의 활력은 춘기발동기가 도래한 후 20주령까지 높은 비율로 증가하였으나 사정빈도가 증가함에 따라 사정량은 급격히 감소한 반면 주당 총 정자수와 활력있는 정자수는 오히려 많아지는 경향을 보고하였다. 한편 Cunningham 등(1967)은 2세에 도달한 앵거스와 헤어포드종의 내동성 시험에서 적어도 1ml당 정자수가 396×10^6 개 이상인 정액의 회수율은 40%였으며 이러한 동결 가능정액의 회수는 춘기발동기가 지난 후 60주령에서 얻을 수 있었고 수소의 연령이 증가함에 따라 다소 개선되는 경향이였다. 그러나 동결 가능정액에서 운동성은 수소의 연령 증가에 따라 개선되는 경향을 보이진 않았지만 동결저장하고 3주가 지난후에 융해하였을 때 정자의 운동성은 개선되는 경향이였다. 이러한 결과는 많은 육우품종에서 춘기발동기가 지난후 60주령에 후대검정 프로그램에서 적절히 사용될 수 있음을 보고한 바 있다. 소에서 주로 사용되는 정액희석제로는 egg yolk tris extenders나 milk extenders가 널리 이용되고 있다(Bilodeau 등, 2002; Ahmad 등, 1987; Ahmad 등, 1985). 한편 한우와 같은 토종 유전자원의 멸실위험이 지속적으로 증가되는 경향에 놓여 있고 특히 한우 산업에 있어서 사육두수가 크게 감소하여 이를 대체하고자 생우를 수입하여 사육하기 시작하였고, 젖소암소에 한우정액을 인공수정하는 농가가 늘어나고 있으므로 교잡종이 지속적으로 늘어날 것으로 전

망된다. 그간 한우의 외형적인 체구와 체중은 크게 증가하였고 이에 따른 정자 생성능력, 정액의 양과 총 정자수 등 일반 성상의 변화를 조사하고 간편하게 정액을 동결하는 기술을 개발하여 이를 유전자원으로써 보존하고자 한다.

재료 및 방법

1. 공시축

정액을 채취하고 동결보존하기 위한 종모우 계통 중에서 다유형은 어미의 유량을 측정하거나 또는 어미의 이유시 체중을 기준하여 육종가 상위 10% 이내의 자손에서 성장발육의 충실도 및 외모심사의 결격사유가 없으며 또한 법정 전염병 검진 결과 정상인 개체에서 7두의 종모우를 선발하였다.

또한 고급육형은 육질에 대한 육종가 상위 10% 이내의 자손에서 외모심사 등에 결격사유가 없는 개체 6두를 선발하여 총 13두의 종모우를 시험에 공시하였으며 이들 종모우들은 일일 1시간 정도 원형틀에서 운동을 실시하고 주 2회 채정하였다.

2. 정액채취 방법

정액을 채취하기 전에 종모축의 생식기 주위, 의빈대 및 인공질은 소독을 실시하였으며, 의빈대에 수소를 고정시키고 채정 대상 종모우의 성적홍분을 고조시키기 위하여 3회 가승가를 실시하였고, 정액 채취방법은 인공질법을 이용하였으며 인공질 내에는 무독성 수용성 Lubricant(Surgilube, USA)로 내부를 도포하였고 인공질내의 수온은 45°C 로 조절하였으며 정액량은 2회 채정량을 합하여 산출하였고, 종모우 개체당 각각의 인공질을 사용하였으며 정액채취후 37°C 수조에 보존하여 10분 이내 실험실로 운송하였다.

3. 정액 검사방법

실험실로 운송한 정액은 1차적으로 정액량을 조사하였고 정액의 색상검사와 pH Test Strips(Sigma P4536, USA)을 이용하여 pH를 측정하였다. 정자의 농도 검사는 멜랑주를 이용하여 원정액을 D·W에 200배 희석한 후 헤모사이트 미터에서 3회 판

결과 및 고찰

정검사 결과를 평균하였고, 정자의 운동성은 37°C Warm plate 위의 슬라이드 글라스에서 현미경검사로 관찰하였으며, 정상성은 0.32M 포도당 용액을 사용하여 희석한 후 400배에서 검정하였다. 정자의 생사염색액은 Eosin Blue 1.0g과 Aniline blue 4.0g을 1/8M phosphate buffer 100ml에 첨가하였고, 85°C의 Water Bath에서 10분간 가온 하였으며, pH를 6.6으로 조정한 후 5°C에서 보존하여 사용하였다.

정자의 생사염색 방법은 Slide glass를 alcohol로 깨끗이 닦아 이물질을 제거하고 30 μ l의 염색액을 넣고 정액을 한방울 떨어뜨린 후 백금으로 혼합하고 Slide glass위에 도말하였으며 45~55°C Warm plate 위에서 건조시킨 후 현미경하에서 검정하였다.

4. 정액의 동결보존

정액의 동결보존액은 Table 1과 같이 glycerol을 7% 첨가한 난황 Tris액을 이용하였으며, 원정액의 정자농도 검사 결과에 따라 0.5ml 스트로우 내에 2천 5백만 개의 정자가 적재되도록 하였다. 1차 희석은 원정액과 희석액이 37°C인 상태에서 동량희석한 후 개체별로 추가로 조정되었고, 2차 희석은 글리세롤이 14% 함유된 희석액을 이용하여 5°C 냉장실에서 최종희석을 한 후 12시간 평형을 시켰으며, 동결방법은 간이동결로써 액체질소 5cm 위에서 5분간 정지한 후 액체질소에 침지하였다.

Table 1. Compositions of egg yolk-tris extender

Component	Concentration (mM)	g/L
Tris	121.1	30.2
Fructose	180.2	10
Citric acid	294.1	17.8
Egg yolk	%(v/v)	10
Glycerol	%	7
Gentamycin	mg/ml	10
Streptomycin		0.3

1. 한우 정액의 일반 성상

다유 및 고급육계통의 한우 종모우 13두로부터 채취한 정액의 일반 성상은 Table 2와 같다. 정액의 색상은 13두 모두 유백색을 나타내었으며 정액 채취량은 3.0~8.0ml였고 평균 5.7ml로 나타났다. 정자수는 $723 \times 10^6 \sim 1,354 \times 10^6$ /ml였으며, 평균 975×10^6 /ml로 조사되었고, 한우정액의 pH는 6.6~6.9의 분포를 보였으며 평균 6.8로 나타났다.

다유계통의 종모우는 7두가 선발되었고 이들 종모우 정액의 색상은 7두 모두 유백색이었고, 정액 채취량은 3.0~6.9ml로 나타났으며 평균 5.31ml였다. 정자수는 $723 \times 10^6 \sim 1,354 \times 10^6$ /ml로 나타났고 평균 950×10^6 /ml이었으며 pH는 6.6~6.9의 범위에 있어 평균 6.8을 나타내었다. 한편 고급육계통의 종모우는 6두가 선발되었으며 정액의 색상은 모두 유백색이었고, 정액 채취량은 4.9~8.0ml였으며 평균 6.16ml로 조사되었다. 정자수는 $848 \times 10^6 \sim 1,280 \times 10^6$ /ml의 범위를 보였고 평균 $1,003 \times 10^6$ /ml로 나타났으며 pH는 6.6~6.9였으며 평균 6.73을 나타내어 계통간 차이가 인정되지 않았다.

이러한 결과는 Furman 등(1975)이 2세의 헤어포드종의 종모우를 공시하여 전기자극법으로 정액을 채취하였을 때 본 연구결과와 달리 pH가 7.4로 다소 높아지는 경향이었고, 정자수에 있어서도 2319×10^6 /ml개로 배이상 높은 경향을 보고하였으나 Ruttle 등(1975)은 헤어포드종과 브랑거스종을 공시하여 인공질법으로 정액을 채취하였을 때 정액채정량은 계절적 요인에 따라 영향을 미치며 2.26~3.32ml로 오히려 한우에 비해 적게 생산되는 경향이었고, 체중에 있어서는 300~499kg에서 2.39 ml, 500~649kg에서 3.25ml, 그리고 650kg 이상에서는 3.13ml가 채정되어 체중이 증가할수록 정액생산량이 증가하기는 하나 체중이 지나치게 증가하면 오히려 정액생산량이 감소하는 경향이 있음을 보고한 바 있다.

임 등(1975)이 보고한 바에 의하면 한우정액의 pH는 6.2~6.6이었고 평균 6.4로써 본 연구 결과보다는 pH가 다소 높게 나타났음을 보고하였고 정액

Table 2. Characteristics of semen in Hanwoo

Line	Bull	Characteristics			
		Volume(ml)	Sperm no. ($\times 10^6$)	Color	pH
HMQ	9702	5.8	863	milk-white	6.6
HMQ	9869	5.5	848	"	6.7
HMQ	9877	5.0	1,280	"	6.8
HMQ	9817	4.9	980	"	6.7
HMQ	99001	8.0	963	"	6.7
HMQ	99028	7.8	1,084	"	6.9
Average		6.2 ^a	1,003		6.7
MM	9731	3.0	884	"	6.9
MM	9846	6.0	1,354	"	6.9
MM	9754	5.8	963	"	6.7
MM	9756	4.0	934	"	6.9
MM	9766	5.0	1,044	"	6.8
MM	9714	6.5	723	"	6.6
MM	99044	6.9	754	"	6.8
Average		5.3 ^b	951		6.8
Average		5.7	975		6.8

^{a,b} Means with different superscript are significant different ($P < 0.05$).

HMQ : High Meat Quality Line, MM : Much Milk Line.

채취량은 1.8~8.0ml로 나타났으며 평균 채정량은 4.4ml로써 본 연구에서의 채정량 5.7ml보다는 다소 적은 경향을 나타낸 반면 정자수는 $2,600 \times 10^6$ 개로써 오히려 많은 경향을 나타내어 이는 연구자 간의 다소간의 차이와 채정빈도에 의한 차이에 기인한 것으로 생각된다.

2. 한우 정액의 동결 보존

다유 및 고급육계통의 한우 종모우 13두로부터 채취한 정액의 생존성과 생산량은 Table 3과 같다. 원정액의 생존성은 80.5~98.0%였으며 평균 90.2%로 나타났고 동결융해후 생존성은 55.8~75.2%로 다양하게 나타났으며 평균 65.7%로써 개체간에

차이가 있었으며 개체별 동결정액의 생산량은 304~800 스트로로 모두 6,870개를 생산하여 동결 보존하였다.

다유계통의 종모우는 7두가 선발되었고 원정액의 생존성은 80.5~94.0%로 나타났고 평균 88.5%였으며, 동결융해후 생존성은 55.8~73.0%로 개체간의 내동성의 차이가 많았으며 평균 65.9%가 생존하여 총 3,527스트로의 다유계통 한우정액을 보존하였다.

한편 고급육계통의 종모우는 6두가 선발되었으며 원정액의 생존성은 87.4~98.0%로 차이가 별로 없었고, 평균 92.0%가 생존하였다. 동결융해후 생존성은 56.9~75.2%로 개체간의 차이가 다유계통

Table 3. Viability and produced straws of semen in Hanwoo

Line	Bull	Viability (%)		Color of straw	Produced straws
		Before-frozen	After-frozen		
HMQ	9702	90.5	75.2	brown	520
HMQ	9869	95.0	57.0	blue	800
HMQ	9877	98.0	65.0	red	510
HMQ	9817	93.0	66.0	red	500
HMQ	99001	87.4	56.9	green	502
HMQ	99028	88.6	73.0	brown	511
Average		92.0 ^a	65.5		3,343
MM	9731	80.5	55.8	clearness	550
MM	9846	89.0	73.0	green	673
MM	9754	91.5	71.2	green	500
MM	5956	90.5	65.8	green	500
MM	9766	92.0	63.0	green	500
MM	9814	94.0	67.0	green	500
MM	99044	82.3	65.7	red	304
Average		88.5 ^b	65.9		3,527
Average or Total		90.2	65.7		6,870

^{a,b} Means with different superscript are significant different(P<0.05).

HMQ : High Meat Quality Line, MM : Much Milk Line.

과 유사하게 나타났으며 평균 65.5%가 생존하였고 총 3,343스트로를 보존하였으며 계통간 원정액의 평균 생존성에서 유의성이 인정되었다(P<0.05).

정액희석제에 egg yolk를 사용한 시험에서 Smith 등(1979)은 난황이 1~32%까지 다양하게 첨가 되었으며 그중에서 16~32% 첨가구가 생존율이 가장 높았다고 보고하였고, 특히 1~2%첨가시 생존율이 감소한 반면 16~32% 첨가구에서는 첨체 정상성 비율이 감소되는 않는 경향을 보여 생존율이 높아질 수 있었다고 보고하였다. Chen 등(1993)은 정액의 동결보존시 동결속도가 정자의 생존성에 미치는 영향에서 분당 -5℃보다는 -15℃나 -35℃에서 생존성이 높았다고 보고하였고 Wall

등(1999)은 희석제 종류에 따른 수태율에 있어서 Tris extender나 Whole milk extender에 있어서 각각 71.0%와 72.6%로써 차이가 없었다고 하였다.

본 실험에서는 급속동결에 의한 정액 동결방법으로써 -70℃에서 5분간 평형을 시킨 후 즉시 -196℃까지 하강시키는 것으로 평균 생존성은 65.7%로 나타났고, Chen 등(1993)이 유사한 조건인 분당 -100℃에서 5분간 평형하고 즉시 -196℃까지 동결시켰을 때 생존성이 70%라고 보고한 것과 비슷한 경향이였다. 한편 Robert 등(2003)은 희석제에 항산화제를 0에서 2.0% 첨가하고 Tempo나 Tempol을 첨가한 조건에서 동결융해후 활력 있는 정자의 비율이 Whole milk extender구의 15~35%

보다는 egg yolk extender구에서 55~58%로써 월등히 높은 것으로 보고하였다. Tempo나 Tempol은 화학적으로 SOD(superoxide dismutase)와 유사한 작용을 하며 소정자의 생존성을 증가시키는 것으로 보고한 바 있다. 품종에 따른 내동성 조사에서는 난황 트리스액을 이용하였을 때 홀스타인에 비해 심멘탈에서 생존성이 더 우수했다고 보고하였다(Thun 등, 2002). 또한 같은 실험에서 동결시 4℃에서 스트로에 심멘탈정액을 적재한 것에서 생존성이 69%로 가장 높게 나타났고 18~22℃ 상온에서 홀스타인의 정액을 적재한 것이 57.3%로 다소 떨어지는 성적이 나타났으며, 본 시험과 유사한 조건에서의 성적이 69%였던 것과 비교하여 본 시험의 계통별 평균 생존성인 65.7%와 거의 일치하는 것으로 나타났다.

이상의 결과로 미루어 한우 정액의 동결보존시 egg yolk extender를 정액희석제로 사용하였을 때 생존성에 문제가 없을 것으로 생각되며, 동결방법에 있어서 간식 급속동결을 하여도 생존성이 저하되지 않고 보존할 수 있을 것으로 사료된다.

적 요

한우의 유전자원을 보존하기 위하여 정액동결 시험을 수행하였으며 고급육계통은 육질에 대한 육종가 상위 10% 이내의 자손에서 선발하였고 다육계통은 어미의 이유시 체중에 대한 육종가 상위 10%이내의 자손에서 선발하였으며 2개 계통에서 종모우 총 13두를 선발하여 공시하였다. 정액채취는 인공질법으로 실시하였고 의빈대에 수소를 계류하고 채정대상우를 증가시켰으며, 3회 가승가후에 채정하였다. 채정후 10분 이내에 실험실로 옮겨와 검사항목을 조사하고 37℃에서 1차 희석을 하고 5℃까지 하강한 후 2차 희석을 하였으며, 액체 절소 5cm 위에서 5분간 평형후 침지하여 동결하였다. 이들 종모우 정액의 일반적 성상에 있어서 채정된 정액량은 1차와 2차를 합하였을 때 평균 채정량이 5.7ml였고 정자농도는 975×10^6 개였으며 정액의 색상은 유백색이었고 pH는 6.8이었다. 채취시 생존성은 90.2% 그리고 동결 용해후에는 65.7%가 생존하였으며 총 6,870스트로우의 동결

정액을 생산하여 보존하였다.

참고문헌

- Ahmad K and Foote RH. 1985. Motility and fertility of frozen bull spermatozoa in tris yolk and milk extenders containing amikacin sulfate. *J. Dairy. Sci.*, 68(8):2083-2086.
- Ahmad K, Foote RH and Kaproth M. 1987. Antibiotics for bull semen frozen in milk and egg yolk extenders. *J. Dairy. Sci.*, 70(11): 2439 - 2443.
- Almquist JO and Cunningham DC. 1967. Reproduction capacity of beef bulls. I. Postpuberal changes in semen production at different ejaculation frequencies. *J. Anim. Science*, 174-181.
- Bilodeau JF, Blanchette S, Cormier N and Sirard MA. 2002. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk tris extenders protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviduct fluid catalase. *Theoriology*, 57(3):1105-1122.
- Chen Y, Foote RH, Tobback C, Zhang, L and Hough S. 1993. Survival of Bull Spermatozoa Seeded and Frozen at Different Rates in Egg Yolk-Tris and Whole Milk Extenders. *J. Dairy Sci.*, 76:1028-1034.
- Cunningham DC, Almquist JO, Pearson RE and Martig C. 1967. Reproduction capacity of beef bulls. II. Postpuberal relations among ejaculation frequency, sperm freezability and breeding potential. *J. Anim. Science*, 182-187.
- Furman JW, Ball L and Seidel GE. Jr. 1975. Electro ejaculation of bulls using pulse waves of variable frequency and length. *J. Anim. Science*, 40(4):665-670.
- Im KS, Suh KS, Kim JK, Sul DS and Lee YB. 1975. Studies on quality, preservability and freezability of bull spermatozoa of Korean native cattle. *Korean. J. Anim. Science*, 17(3): 271-274.

- Johnson LA and Gerrits RJ, James Bond and Oltjen, R. R. 1971. Growth and reproductive performance of bulls and heifers fed purified and natural diets. IV. Semen characteristics, body measurements and fertility of bulls(22 to 156 weeks of age). *J. Anim. Science*, 33(4):808-813.
- Robert H, Foote, Charles, Brockett, C and Michael, T. Kaproth. 2002. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Animal Reproduction Science*, 71(1): 13-23.
- Ruttle J, Zere Ezaz L and Sceery EJ, 1975. Some factors influencing semen characteristics in range bulls. *J. Anim. Science*, 41(4):1069- 1076.
- Smith RL, Berndtson WE, Unal MB, Pickett BW 1979. Influence of percent egg yolk during cooling and freezing on survival of bovine spermatozoa. *J. Dairy Sci.*, 62(8):1297- 303.
- Thun R, Hurtado M and Janett F. 2002. Comparison of biociphos-plus and tris-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. *Theriogenology*, 57(3):1087-1094.
- Wall RJ and Foote RH. 1999. Fertility of sperm frozen and stored in clarified yolk-Tris-glycerol extender. *J. Dairy Sci.*, 82(4):817-21.
-
- (접수일: 2003. 7. 1/ 채택일: 2003. 8. 2)