



## 말 냉장 정액의 정장 비율과 호기 또는 혐기 조건이 운동성에 미치는 효과

박용수<sup>1</sup>, 양재혁<sup>1</sup>, 조영재<sup>2</sup>, 강옥득<sup>3</sup>, 조길재<sup>4,†</sup>

<sup>1</sup>국립한국농수산대학, <sup>2</sup>한국마사회, <sup>3</sup>성덕대학교, <sup>4</sup>경북대학교

### Effect of the concentrations of seminal plasma and aerobic or anaerobic condition on the motility of cooled equine semen

Yong-Soo Park<sup>1</sup>, Jae-Hyuk Yang<sup>1</sup>, Young-Jae Cho<sup>2</sup>, Ok-Deuk Kang<sup>3</sup> and Gil-Jae Cho<sup>4,†</sup>

<sup>1</sup>Korea National College of Agriculture and Fisheries, Jeonju, Jellabuk-do, Republic of Korea

<sup>2</sup>Jangsu Stud Farm, Korea Racing Authority, Jangsu, Jellabuk-do, Republic of Korea

<sup>3</sup>SungDuk University, Yeongcheon, Gyeongsangbuk-do, Republic of Korea

<sup>4</sup>College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Buk-gu, Daegu, Republic of Korea

#### Abstract

The purpose of this study was to investigate the effects of the concentration of seminal plasma in aerobic and anaerobic conditions on the total motility(TM) and the progressive motility(PM) of spermatozoa in long term preservation of cooled equine semen. We also examine the pregnancy rates after artificial insemination using fresh, cooled or frozen semen, and different durations of cooled-preserved equine semen. In the aerobic state of cooled-preserved semen, As the increase of preserved duration to 24h, 48h, 72h, and 96h, TM tended to decrease in each of different concentrations of formalin-containing experimental group, TM tended to decrease regardless of the concentrations of SP. In different concentrations of SP, TM of without seminal plasma(SP W/O) group tended to be higher than that of SP 20%, SP 33% and SP 50%, especially TM of SP W/O group was significantly higher than other groups at 96 h ( $p<0.05$ ). PM was higher in the groups of SP W/O and SP 20% than in the groups of SP 33% and SP 50% from 24 h to 72 h in cooled-preservation, especially PM of SP W/O group was significantly higher than other groups at 96 h ( $p<0.05$ ). In the anaerobic condition of cooled-preserved semen, the results of TM and PM at different concentrations of SP were similar to the results in the aerobic condition although there was a difference in the ratio. The pregnancy rates of fresh-cooled, cooled-preserved and frozen semen were 66.3%, 60.7% and 34.5%, respectively, and the pregnancy rate of frozen semen was the lowest. We also found that it is possible to pregnancy after artificial insemination using 72 h cooled-preserved equine semen. There was similar of the pregnancy rates in the different month from April to August.

Received : 16 March 2018  
Revised : 26 March 2018  
Accepted : 27 March 2018

**Key Words** : Equine, Seminal plasma, Cooling, Artificial insemination

† Correspondence: Gil-Jae Cho (0000-0001-6848-7335)  
Phone: +82-53-950-5978  
E-mail: [chogj@knu.ac.kr](mailto:chogj@knu.ac.kr)

## 서론

세계적으로 인공수정이 가축과 말에서 시술되고 있으며, 애완동물과 야생동물에서도 시술이 증가하고 있으며, 수정란이식을 비롯한 생명공학기술에도 기본 기술이기도 하다. 말 번식 분야에서도 인공수정으로 태어난 망아지의 등록이 허용된 이후 사용이 급격히 증가하였다(Aurich, 2012). 말의 인공수정에는 신선, 냉장 및 동결 정액이 이용되고 있고, 신선과 동결 정액은 주로 번식센터 내에서 활용되며 생산 목장에서는 주로 냉장 정액을 이용하고 있다. 인공수정의 활용 비율이 북미지역은 88%, 유럽의 독일과 프랑스는 90% 이상이며 이중에서 냉장 정액의 비율이 87% 정도로 대부분을 차지하고 있다(Loomis와 Graham, 2008; Aurich, 2012). 국내에서도 말 정액의 동결과 정액 형태에 따른 보존과 임신율에 대한 기초적인 연구가 진행되었다(Park 등, 2011). 말 냉장 정액은 정액 채취, 희석 및 운송 등의 문제로 인하여 최소한 24-48시간 동안 안정적인 생존율이 유지되어야 한다. 국내에서도 냉장 정액을 농장에서 활용 하기 위해서는 채취-희석-운반-인공수정(1회/2회)까지 소요 시간을 고려하면 최소 48-72시간 동안은 안정적인 생존율이 보장되어야 한다. 하지만 말 냉장 정액의 임신율이 자연교배나 신선 정액에 비하여 낮은 원인 중 하나는 냉장 보존 24시간 이후의 급격한 정자 운동성 저하와 관련이 있다고 보고하였다(Brinkerhoff 등, 2010).

냉장 정액의 보존에 영향을 미치는 요인으로는 씨수말 원정액의 품질, 채취 방법, 희석액의 조성 등이 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Amann와 Pickett, 1987; Ecot 등, 2000). 정자 보존성 향상을 위하여 정장(Seminal Plasma; SP) 분리 연구(Love 등, 2012), 보존 온도와 조건(Batellier 등, 2001), 장기 보존성 연구(Kiser 등, 2014), skim-milk(Bustamante 등, 2009), casein(Masuda 등, 2004), 항산화제첨가(Silva 등, 2012) 등의 보고가 있으나, 각각의 연구 방법에 따라 저온 보존 방법 및 결과가 차이가 있다. 정자의 대사과정에 산소의 존재 유무는 정자의 운동성과 관련이 있고, milk-based 희석제에서는 호기 상태가 혐기 상태에 비하여 정자의 운동성이 높았으나, native chosphocaseinate 희석제에서는 4℃ 24시간 보존에는 혐기 조건이 15℃ 72시간 보존에는 호기 조건이 정자의 수정능 유지에 효과적이라고 보고하였다(Vidament 등, 2012). 따라서 국내 말 분야에서 안정적인 인공수정을 위해서는 냉장 정액의 장기 보존 조건 설정이 선행되어야 하며 희석제, SP 비율, 보존 온도 및 산소 존재 등에 대한 다양한 검토가 필요할 것으로 생각된다. 한편, 말 냉장 정액에 포함되는 SP의 비율과 산소 조건(호기성 vs. 혐기성)에 따른 장기(72시간 이상) 냉장 보존성에 대한 조사 보고는 없었다.

인공수정시 임신율은 조건에 따라 변이가 아주 심하여(Samper 등, 1991; Samper와 Morris, 1998), 1회 발정주기의 임신율이 냉장정액은 39%-65%, 동결정액은 32%-73%로 보고되고 있다(Loomis, 2001; Vidament, 2005). 하지만 임신율의 차이에도 불구하고 자연종부와 다양한 형태의 정액으로 인공수정한 망아지의 출산율은 비슷한 경향이다(Vidament, 2005). 한편 국내에서는 말의 인공수정 임신율이 신선, 냉장 및 동결 정액이 각각 60%, 50% 및 37.5%로 보고되어 국외 결과 보고와 비교하여 낮은 수준이며 시험 두수도 적어 향후 관련 기술의 개발을 통한 임신율 제고가 필요한 실정이다(Park 등, 2008; Park과 Cho, 2011). 특히, 냉장 정액의 보존 시간에 따른 임신율에 대한 보고가 없어, 말 인공수정 활성화를 위해서는 정액의 장기 냉장 보존에 따른 임신율의 조사가 필요하다.

본 연구에서는 냉장 정액의 장기보존에 미치는 정장의 함유 비율과 호기성 및 혐기성 조건이 말 정자의 생존율과 직진운동성에 미치는 효과를 조사하였고, 말 정액의 형태와 냉장 보존 정액의 보존 시간에 따른 임신율을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 씨수말

정액 채취는 한국마사회 장수목장에서 사육중인 승용 씨수말(웹블러드 종, 6세 및 12세) 2두를 이용하였다. 각각 씨수말은 '16년도 인공수정 사업에 공시된 말 중에서 수태율이 양호하다고 판단되는 개체로 선정하였다. 씨수말의 관리는 한국마사회 장수목장의 씨수말 일반관리 방법에 준하여 실시하였다.

### 2. 정액 채취 및 희석

씨수말은 충분히 시정한 후 발정기 씨암말에 승가를 시켰다. 정액은 CSU type artificial vagina(ARS, Chino, CA, USA)에 필터가 장착된 채취병을 부착하여 채취하였으며, 채취한 정액은 즉시 INRA96(INRA, French) 희석액으로 상온에서 정액과 1:1(v:v)로 희석 상온에서 정액과 1:1(v:v)로 희석하였고, 정자농도를 측정하였다. 최종 냉장 정액의 정장 함유 비율과 보존방법은 실험 목적에 따라 최종 정자 농도는  $100 \times 10^6/\text{ml}$ 로 조정하였다.

### 3. 정액 분류

Fresh-cooled 정액은 채취직후 정액과 희석액을 1:1(v:v)로 희석하여 3시간 이내 보존한 것이다. 실험 조건에 따른 정액의 분류는

각각 without seminal plasma(SP W/O; 1000g 10분 원심분리 후 정자괴를 회수하여 희석액 희석), SP 20%(1:4 정액 volume vs. 희석액 volume), SP 33%(1:2 정액 volume vs. 희석액 volume), SP 50%(1:1 정액 volume vs. 희석액 volume)로 각각 구분 하였다. 호기조건과 혐기조건 설정은 각 배율로 희석한 정액을 20ml 주사기(Norm-Ject, Henke Sass WOLF, Germany)에 10ml씩 분주한 후 호기조건은 동량의 공기를 추가하였다(Batellier 등, 2001). 동결정액은 Park과 Cho(2011)의 방법에 준하여 동결 및 보관된 것을 사용하였다.

**4. Total motile (TM)과 Progressive motile (PM) 측정**

냉장 보존 정액을 37°C 수조에서 1분간 담근 후 잘 혼합한 정액 10ul를 counting chamber에 넣고 SpermVision system(Minitube, Germany)에서 3회 측정하여 mean±SD로 TM과 PM을 측정하였다.

**5. 인공 수정 및 임신 진단**

인공수정에 사용된 암말은 국내 말 생산 농장 또는 승마장에서 한국마사회 장수목장으로 인공수정을 신청한 암말 중 임신을 조사 가능한 239두를 선정하였다. 인공 수정은 발정 징후를 나타내는 씨암말을 12시간 간격으로 난소의 크기를 측정하였다. 동결정액, Fresh-cooled 또는 cooled-transported 정액을 이용하였다. Fresh-cooled 및 cooled-transported 정액은 발정 후 난포가 ≥3.5cm에 도달하였을 때 24시간 간격으로 2회 인공수정을 하였다. 동결정액은 발정기 암말을 12시간 간격으로 초음파 검사를 하여 배란직전 난포 크기(약 4.5 - 5cm)에 도달하였을 때 인공수정 하였고, 이후 12시간 간격으로 배란 검사를 하여 미배란인 경우 24시간 간격으로 추가 인공수정 하였다. 임신 진단은 초음파(Honda, Japan)를 이용하여 수정 후 15일, 및 40일에 확인하였다.

**6. 임신을 조사**

인공수정 임신율은 동결정액, Fresh-cooled 및 Cooled-transported 정액의 결과를 조사하였고, Cooled-transported 정액은 각각 24h, 48h, 72h 및 96h 보존 결과와 인공수정 장소 및 계절(월)로 구분하여 조사하였다.

**7. 통계 처리**

TM과 PM은 Mean±SD로 나타냈으며 각각의 평균에 대한 통계학적 분석은 SAS package를 이용하여 분산 분석 후 Duncan's 다중 검정을, 임신율은  $\chi^2$ -test를 실시하였다.  $p < 0.05$  수준에서 유의차를 검정하였다.

**결 과**

말 정액에 포함된 정자의 함유 비율과 호기상태로 냉장 보존이 정자의 생존율에 미치는 효과를 조사한 결과는 Table 1과 같다. 정액 채취-희석 직후의 생존율은 71.5% - 80.1%로 유의적인 차이가 없었다. 정장제거군(SP W/O)의 생존율이 냉장보존 시간이 경과함에 따라 48시간 및 72시간째에 유의하게 감소하는 경향이였다( $p < 0.05$ ). 정장 20% 함유군(SP 20%)은 24시간 및 96시간째, 정장 33% 함유군(SP 33%)은 24시간 및 96시간째 그리고 정장 50% 함유군(SP 50%)은 24시간 및 48시간째에 생존율이 유의적으로 낮아졌다( $p < 0.05$ ). 한편 냉장 보존 24시간째의 정장 함유 비율에 따른 정자의 생존율은 차이가 없었으나, 48시간째는 SP 50%, 72째는 SP 33%, 96시간째는 SP 20%군이 SP W/O 군에 비하여 유의하게 낮아졌다( $p < 0.05$ ).

**Table 1.** Effect of seminal plasma concentration and storage time on total motile of spermatozoa preserved in aerobic state

	after dilution	24h	48h	72h	96h
SP W/O	73.8±4.8 <sup>A</sup>	54.3±5.3 <sup>BC,a</sup>	58.5±4.3 <sup>B,a</sup>	50.3±5.0 <sup>C,a</sup>	49.9±5.9 <sup>C,a</sup>
SP 20%	80.1±4.7 <sup>A</sup>	56.0±5.4 <sup>B,a</sup>	59.5±6.2 <sup>B,a</sup>	47.6±7.6 <sup>B,a</sup>	30.1±3.7 <sup>C,b</sup>
SP 33%	75.7±2.6 <sup>A</sup>	39.2±4.8 <sup>B,ab</sup>	43.0±7.5 <sup>B,b</sup>	33.5±6.4 <sup>B,b</sup>	16.6±4.8 <sup>C,bc</sup>
SP 50%	71.5±3.2 <sup>A</sup>	35.8±2.2 <sup>B,b</sup>	11.2±4.2 <sup>C,c</sup>	7.7±6.4 <sup>C,c</sup>	7.2±5.5 <sup>C,c</sup>

<sup>A,B,C</sup> Different superscripts with same column are significantly differ( $p < 0.05$ )

<sup>a,b,c</sup> Different superscripts with same row are significantly differ( $p < 0.05$ )

SP W/O : without seminal plasma

SP 50% : with 50% seminal plasma(1:1 volume to volume)

SP 33% : with 33% seminal plasma(1:2 volume to volume)

SP 20% : with 20% seminal plasma(1:4 volume to volume)

• 말 냉장 정액의 정장 비율과 호기 또는 혐기 조건이 운동성에 미치는 효과

말 정액에 포함된 정장의 함유 비율과 호기상태로 냉장 보존이 정자의 직진운동성에 미치는 효과를 조사한 결과는 Table 2와 같다. 정액 채취-희석 직후의 직진운동성은 각각 45.9 - 60.5%로서 SP 20%군이 높은 경향이었으나 유의차는 없었다. SP W/O군의 직진운동성은 24시간째에 34.5%로 유의하게 낮아졌으나( $p<0.05$ ), 96시간까지는 비슷한 수준으로 유지되었다. SP 20%군과 SP 33%군에서는 24시간과 96시간에 유의하게 낮아졌고, SP 50%군은 24시간 및 48시간에 유의하게 낮아지는 경향이 있었다( $p<0.05$ ). 한편 냉장 보존 24시간, 48시간 및 72시간의 정장 함유 비율에 따른 정자의 직진운동성은 SP W/O군과 SP 20%군에 비하여 SP 33%군 및 SP 50%군이 유의하게 낮았고, 특히 96시간째에는 SP W/O군의 직진운동성이 다른 군에 비하여 유의하게 높았다( $p<0.05$ ).

**Table 2.** Effect of seminal plasma concentration and storage time on progressive motile of spermatozoa preserved in aerobic state

	after dilution	24h	48h	72h	96h
SP W/O	47.8±10.5 <sup>A</sup>	34.5±9.4 <sup>B,a</sup>	36.6±5.7 <sup>B,a</sup>	30.9±4.6 <sup>B,a</sup>	37.4±7.8 <sup>B,a</sup>
SP 20%	60.5±6.2 <sup>A</sup>	36.8±8.0 <sup>B,a</sup>	38.9±2.2 <sup>B,a</sup>	29.9±8.2 <sup>BC,a</sup>	22.7±3.9 <sup>C,b</sup>
SP 33%	45.9±2.6 <sup>A</sup>	26.1±4.4 <sup>B,b</sup>	27.2±7.7 <sup>B,b</sup>	17.7±7.0 <sup>BC,b</sup>	9.3±6.8 <sup>C,bc</sup>
SP 50%	46.3±5.3 <sup>A</sup>	17.8±8.9 <sup>B,b</sup>	2.9±2.0 <sup>C,c</sup>	2.5±2.2 <sup>C,c</sup>	2.7±2.6 <sup>C,c</sup>

<sup>A,B,C</sup> Different superscripts with same column are significantly differ( $p<0.05$ )

<sup>a,b,c</sup> Different superscripts with same row are significantly differ( $p<0.05$ )

SP W/O : without seminal plasma

SP 50% : with 50% seminal plasma(1:1 volume to volume)

SP 33% : with 33% seminal plasma(1:2 volume to volume)

SP 20% : with 20% seminal plasma(1:4 volume to volume)

말 정액에 포함된 정장의 함유 비율과 혐기상태로 냉장 보존이 정자의 생존율에 미치는 효과를 조사한 결과는 Table 3과 같다. 정액 채취-희석 직후의 생존율은 71.7% - 81.7%로 차이가 없었다. SP W/O군의 생존율은 냉장보존 72시간에 평균 44.6%로 유의하게 낮아졌다( $p<0.05$ ). SP 20%군은 냉장보존 48시간 및 72시간, SP 33%군은 냉장 보존 24시간 및 96시간, SP 50%군은 24시간 및 48시간에 유의하게 생존율이 낮아졌다( $p<0.05$ ). 한편 냉장 보존 24시간째의 정자의 생존율은 SP 33%군 및 SP 50%군이 유의하게 낮아졌고, 특히 48시간에는 SP 50%군의 생존율이 다시 유의하게 낮아졌다( $p<0.05$ ).

**Table 3.** Effect of seminal plasma concentration and storage time on total motile of spermatozoa preserved in anaerobic state

	after collection	24h	48h	72h	96h
SP W/O	71.7±9.7 <sup>A</sup>	58.7±9.4 <sup>A,a</sup>	55.8±3.4 <sup>A,a</sup>	44.6±4.0 <sup>B,a</sup>	47.5±9.6 <sup>B,a</sup>
SP 20%	81.7±4.7 <sup>A</sup>	58.6±8.9 <sup>A,a</sup>	56.3±3.5 <sup>B,a</sup>	36.3±3.1 <sup>C,b</sup>	31.2±3.3 <sup>C,a</sup>
SP 33%	75.2±3.6 <sup>A</sup>	49.1±5.1 <sup>B,a</sup>	38.1±5.1 <sup>B,b</sup>	46.5±6.2 <sup>B,a</sup>	9.9±5.6 <sup>C,b</sup>
SP 50%	72.7±3.2 <sup>A</sup>	19.2±4.3 <sup>B,b</sup>	6.6±5.6 <sup>C,c</sup>	4.6±3.2 <sup>C,c</sup>	0.4±0.1 <sup>C,c</sup>

<sup>A,B,C</sup> Different superscripts with same column are significantly differ( $p<0.05$ )

<sup>a,b,c</sup> Different superscripts with same row are significantly differ( $p<0.05$ )

SP W/O : without seminal plasma

SP 50% : with 50% seminal plasma(1:1 volume to volume)

SP 33% : with 33% seminal plasma(1:2 volume to volume)

SP 20% : with 20% seminal plasma(1:4 volume to volume)

말 정액에 포함된 정장의 함유 비율과 혐기상태로 냉장 보존이 정자의 직진운동성에 미치는 효과를 조사한 결과는 Table 4와 같다. 정액 채취-희석 직후의 직진운동성은 각각 평균 46.1 - 67.4%로서 SP 20%군이 높은 경향이었으나 유의차는 없었다. SP W/O군의 직진운동성은 24시간째에 34.5%로 유의하게 낮아졌으며, 72시간째에도 유의하게 낮아졌다( $p<0.05$ ). SP 20%군은 냉장보존 48시간 및 72시간, SP 33%군은 48시간 및 96시간에서 직진운동성이 유의하게 낮아졌다( $p<0.05$ ). SP 50%군의 직진운동성은 24시간과 48시간에 급격히 낮아지는 경향이 있었다( $p<0.05$ ). 한편, 냉장 보존 24시간의 정장 함유 비율에 따른 직진운동성은 SP W/O군, SP 20%군 및 SP 33%군에 비하여 SP 50%군이 유의하게 낮았고( $p<0.05$ ), 72시간 이후에는 SP 20%, SP 33% 및 SP 50%군에 비하여 SP W/O군이 유의하게 높았다( $p<0.05$ ).

**Table 4.** Effect of seminal plasma concentration and storage time on progressive motile of spermatozoa preserved in anaerobic state

	after collection	24h	48h	72h	96h
SP W/O	46.1±9.3 <sup>A</sup>	36.6±1.3 <sup>B,a</sup>	37.0±5.7 <sup>AB,a</sup>	28.9±5.7 <sup>C,a</sup>	31.9±4.4 <sup>C,a</sup>
SP 20%	67.4±5.6 <sup>A</sup>	37.0±8.6 <sup>A,a</sup>	31.0±6.6 <sup>B,a</sup>	20.9±6.1 <sup>C,b</sup>	20.6±3.1 <sup>C,b</sup>
SP 33%	47.5±3.6 <sup>A</sup>	35.5±6.9 <sup>A,a</sup>	20.7±3.1 <sup>B,a</sup>	22.0±2.4 <sup>B,b</sup>	7.8±4.7 <sup>C,c</sup>
SP 50%	51.2±5.3 <sup>A</sup>	11.8±5.0 <sup>B,b</sup>	2.6±2.3 <sup>C,c</sup>	2.9±1.2 <sup>C,c</sup>	0.4±0.2 <sup>C,d</sup>

<sup>A,B,C</sup> Different superscripts with same column are significantly differ( $p<0.05$ )

<sup>a,b,c</sup> Different superscripts with same row are significantly differ( $p<0.05$ )

SP W/O : without seminal plasma

SP 50% : with 50% seminal plasma(1:1 volume to volume)

SP 33% : with 33% seminal plasma(1:2 volume to volume)

SP 20% : with 20% seminal plasma(1:4 volume to volume)

말의 인공수정에 있어서 정액의 형태에 따른 임신율은 채취 직후의 신선정액(Fresh-cooled)이 66.3%로 가장 높았고, 12시간 이상 냉장 보존 정액(Cooled-transported)은 60.7%였고, 동결정액(Frozen)은 34.5%로 낮은 경향이였다(Table 5). Cooled-transported 정액의 보존 시간에 따른 임신율을 조사한 결과, 냉장 보존 시간에 따라 임신율은 41.7% - 100%로서, 12시간 보존이 41.7%로 가장 낮았고, 72시간 보존은 100%로 높은 경향이였으나 유의차는 없었다(Table 6). 월별 임신율을 조사한 결과, 4월 - 8월까지 월별 임신율이 51.4%, 66.7%, 56.3%, 54.5% 및 66.7%로서 차이가 없었다(Table 7).

**Table 5.** Effect of fresh-cooled and cooled-transported and frozen semen on pregnancy rates after artificial insemination in equine

Semen types	Artificial Insemination	Pregnancy	%
Fresh-Cooled	98	65	66.3
Cooled-transported	112	68	60.7
Frozen	29	10	34.5

Fresh-cooled : Artificial insemination within 3 h after collection and dilution

Cooled-transported : Artificial insemination after cooled-transported for more than 3 h after collection and dilution

**Table 6.** Effect of different durations of cooled-transported semen on pregnancy rates after artificial insemination in equine

	Artificial Insemination	Pregnancy	%
Within 12 h	35	20	57.1
12 h	12	5	41.7
24 h	32	21	65.6
48 h	18	12	66.7
72 h	4	4	100

**Table 7.** Monthly Pregnancy rates change by artificial insemination using cooled-transported equine semen

Month	Artificial Insemination	Pregnancy	%
April	35	18	51.4
May	30	20	66.7
Jun	32	18	56.3
July	22	12	54.5
August	6	4	66.7



## 고 찰

정액의 품질에는 씨수말, 채취 방법, 희석액의 조성, 냉각 속도, 포장재료, 냉각속도 및 SP제거를 위한 원심분리 등이 영향을 미친다 (Amann와 Pickett, 1987; Ecot 등, 2000). 특히, SP는 고환, 부고환 및 부생식선에서 분비되며 암컷 생식기로 정자의 운반 기능을 가지며 정자의 생존성, 운동성 및 수정성과 수정능력 향상에 효과적이지만 운동성 억제 인자와 수정능 억제 인자와 같은 유해 작용도 가지고 있다(Bergerone와 Manjunath, 2006). Manjunath 등(2009)는 소 및 말의 정장 단백질의 60%를 차지하고 있는 binder of sperm (BSP) 단백질이 gelatin 및 Cholin phospholipids와 결합기능을 가지고 있고 보고하였다. BSP 단백질은 수정능 획득 과정에서 발생하는 정자 막 지질 변화에 관여하므로 수정에 유효하게 작용한다(Manjunath와 Therien, 2002). 하지만 이 단백질은 부고환 정자의 정자막으로부터 콜레스테롤과 콜린 포스페이트의 유출을 자극하여 24시간 저장 시 정자에서 40%의 콜레스테롤과 콜린 포스페이트의 손실을 유발한다(Bergeron 등, 2004). 즉, 정자막에서 낮은 수준의 콜레스테롤은 저온 충격의 저항성이 감소하므로 장기 보존에 유해하게 작용하여(Darin-Bennett와 White, 1977), 장기간 BSP 단백질이 포함된 정장에 노출된 정자는 지질의 손실에 따른 정자막의 손상이 유발되어 냉장 또는 동결 상태의 보존에 매우 민감해 진다(Manjunath, 2012). 한편 자연 교배에서도 정자에 유해하게 작용하는 BSP 단백질의 제거하는 메커니즘이 존재한다. 질에 사정된 정액은 경관 점액을 헤엄쳐서 소량씩 자궁에 유입되면서 정정을 제거하게 되는 과정을 거치게 된다. 따라서 인공수정과정에서는 BSP 단백질을 제거하는 과정이 없으므로, 정장 원심분리 제거, 희석액 첨가 비율을 조정 또는 희석액에 포함된 난황이나 유단백질의 복합체들을 이용하여 이 물질 조정 할 수 있다.

본 연구 결과 정장 함유 비율에 따른 TM과 PM의 경향이 정장 함유 비율이 낮아질 수 록 높은 경향이었고, 특히 정장 제거군(SP W/O)은 냉장 보존 96시간에서도 TM과 PM 비율이 높게 유지되었다. 인공수정에서도 72시간 냉장보존 정액의 임신율이 양호함을 확인할 수 있었으나(Table 6), 표본수가 적어 유의적인 차이는 없는 것으로 판단되며 추후 72시간 냉장보존 정액의 임신율에 대한 추가 실험이 필요할 것으로 생각된다. 한편, SP W/O군의 TM과 PM 비율이 높게 나타난 것은 정장의 BSP 단백질 제거로 정자의 보존에 유익한 환경이 생성되었고, 또한 원심분리과정을 거치면서 정상 정자의 회수율이 높아졌기 때문인 것으로 생각된다(Vidament 등, 2000).

국외 보고에서 인공수정 임신율은 사용하는 정액의 상태에 따라 신선정액(Fresh-diluted) 70%-80%, 냉장운반(cooled-transported) 60%-70% 그리고 결정액은 발정주기당 32%-73% 및 번식계절당 56%-89%로 보고하였다(Loomis, 2001; Vidament, 2005; Nielsen 등, 2008). 국내에서도 Park와 Cho(2011)이 인공수정 기초 조사에서 신선-희석(Cooled-diluted) 60%, 냉장 운반 정액 50% 및 동결정액 37.5%의 임신율을 보고하였다. 본 연구에서는 Fresh-cooled 정액 66.3%, Cooled-transported 정액 60.7%, 동결정액 34.5%로 이전 연구에 비하여 Fresh와 Cooled 정액의 임신율은 다소 높아졌으나 동결정액은 오히려 낮은 경향이였다. 특히, 본 연구에서는 냉장 장기 보존 정액(72시간)에서도 안정적인 임신율이 확인되어 향후 인공수정 산업화에 기여할 수 있을 것으로 생각된다.

말의 인공수정 임신율에 영향을 미치는 요인으로는 자궁검사, 발정유도 방법, 발정 증상, 주입 정자수, 질 부위의 액체 저류, 씨수말과 씨암말 등이 영향을 미치나(Samper, 1995; Vidament 등, 1997; Nielsen 등, 2008), 인공수정 계절, 월, 자궁 세척 및 낭종은 임신에 영향을 없다고 하였다(Nielsen 등, 2008). 본 연구에서도 4월-8월까지 월별 임신율이 51.4% - 66.7%로 차이가 없었다(Table 7).

## 결 론

본 연구에서는 냉장 정액의 장기보존에 미치는 정장의 함유 비율과 호기성 및 혐기성 조건이 말 정자의 생존율과 직진운동성에 미치는 효과를 조사하였고, 말 정액의 형태와 냉장 보존 정액의 보존 시간에 따른 임신율을 조사하였다.

냉장 정액의 호기상태에서 정장의 함유 비율에 따른 TM 조사 결과, 각각 다른 농도의 정장함유 실험군에서 보존 시간이 24h, 48h, 72h 및 96h으로 증가함에 따라 TM은 낮아지는 경향이였다. 정장 함유 비율에서는 SP W/O군의 TM이 SP 20%, SP 33% 및 SP 50%에 비하여 높은 경향이였고, 특히 96h에서는 유의하게 높은 경향이였다( $p < 0.05$ ). PM은 냉장 보존 24h에서부터 SP/WO군 및 SP 20%군이 SP 33% 및 SP50%군에 비하여 높은 경향이였고, 특히 96h에서 SP W/O군이 유의하게 높았다( $p < 0.05$ ). 한편 냉장 정액의 혐기 상태에서 정장의 함유 비율에 따른 TM과 PM 조사 결과는 비율에는 차이가 있으나 호기상태에서 결과와 비슷한 경향이였다. 인공수정 임신율 조사 결과 Fresh-cooled, Cooled-preserved 및 frozen 정액이 각각 66.3%, 60.7% 및 34.5%로서 동결정액의 임신율이 가장 낮았다. 냉장 정액의 보존 시간에 따른 인공수정 임신율은 보존 12 - 48시간 까지 41.7 - 66.7%로 차이가 없었고, 특히 72시간 보존에서도 임신이 가능함을 확인하였다. 인공수정 월별 조사에서는 임신율이 비슷한 수준 이었다.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries(IPET) through Agri-Bio industry Technology Development Program, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs(MAFRA)(316026).

## REFERENCES

- Amann RP and Pickett BW. 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *J. Equine Vet. Sci.* 7:145-173.
- Aruch HE. 2012. Artificial Insemination in Horses-More than a Century of Practice and Research. *J. Equine Vet. Sci.* 32:458-463.
- Batellier F, Vidament M, Fauquant J, Duchamp G, Arnaud G, Yvon JM and Magistrini M. 2001. Advances in cooled semen technology. *Anim. Reprod. Sci.* 68:181-190.
- Bergeron A, Crete MH, Brindle Y and Manjunath P. 2004. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biol. Reprod.* 70:708-717
- Bergeron A and Manjunath P. 2006. New insights towards understanding the mechanisms of sperm towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Mol. Reprod. Dev.* 73:1338-1344.
- Brinkerhoff JM, Love CC, Thompson JA, Blodgett G, Teague SR and Varner DD. 2010. Influence of mare age, pre-breeding mare statuses, breeding method, and stallion on first-cycle pregnancy rates on a large commercial breeding farm. *Anim. Reprod. Sci.* 121:159-60.
- Bustamante IC, Pederzoli CD, Sgaravatti AM, Gregory RM, Dutra Filho CS, Jobim MIM and Mattos RC. 2009. Skim milk-egg yolk based semen extender compensates for non-enzymatic antioxidant activity loss during equine semen cryopreservation. *Anim. Reprod.* 6:392-399.
- Darin-Bennett A and White IG. 1977. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology.* 14:466-470.
- Ecot P, Vidament M, deMornac A, Perigault K, Clement F and Palmer E. 2000. Freezing of stallion semen: interactions among cooling treatments, semen extenders and stallions. *J. Reprod. Fertil.* 56:141-150.
- Kiser AM, Brinsko SP, Love CC, Varner DD, Sudderth K and Blanchard TL. 2014. Relationship of sperm quality to fertility after 4 days of cooled storage of equine semen. *J. Equine Vet. Sci.* 34:602-605.
- Loomis PR. 2001. The equine frozen semen industry. *Anim. Reprod. Sci.* 68:191-200.
- Loomis PR and Graham JK. 2008. Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Anim. Reprod. Sci.* 105:119-128.
- Love CC, Blanchard TL, Varner DD, Brinsko SP, Voge J, Bliss S, Sudderth K, Teague S and LaCaze K. 2012. Effect of daily semen centrifugation and resuspension on the longevity of equine sperm quality following cooled storage. *Theriogenology* 77:1911-1917.
- Manjunath P. 2012. New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection by extender components. *Anim. Reprod.* 9:809-815.
- Manjunath P, Lefebere J, Jois PS, Fan J and Wright MW. 2009. New nomenclature for mammalian BSP genes. *Biol. Reprod.* 80:394-397.
- Manjunath P and Therien I. 2002. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J. Reprod. Immunol.* 53:109-119.
- Masuda H, Nanasaki S and Chiba Y. 2004. A new extender for preservation of equine spermatozoa at 5°C. *J. Equine Sci.* 15:1-5.
- Nielsen JM, Kofoed Bock TS and Ersbøll AK. 2008. Factors associated with fertility in horse in a Danish equine practice after

- artificial insemination with frozen-thawed semen. *Anim. Reprod. Sci. Suppl.* 107:336-337.
- Park yong-soo and Cho gil-jae. 2011. Factors affecting on the motility of semen and the pregnancy rate of artificial insemination in equine. *J. Emb. Trans.* 26:15-19.
- Park yong-soo, Park hum-dae, Kang yong-seok and Cho gil-jae. 2008. Factors affecting the Smotility and fertility of frozen-thawed stallion semen. *J. Emb. Trans.* 23:161-166.
- Samper JC. 1995. Stallion semen cryopreservation: factors affecting pregnancy rates. *Proc. Soc. Theriogenol.* 160-165.
- Samper JC, Hellander IC and Crabo BG. 1991. Relation between fertility of fresh and frozen stallion semen and its quality measured as sperm motility and with glass wool/sephadex filters. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 44:107-114.
- Samper JC and Morris CA. 1998. Current methods for stallion semen cryopreservation: a survey. *Theriogenology* 49:895-903.
- Silva MC, Seidel GE, Squires EL, Graham JK and Carnevale EM. 2012. Effects of components of semen extenders on the binding of stallion spermatozoa to bovine or equine zonae pellucidae. *Reproduction* 143:577-585.
- Vidament M. 2005. French field results(1985-2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. *Anim. Reprod. Sci.* 89:115-136.
- Vidament M, Dupere AM, Julienne P, Evain A, Noue P and Palmer E. 1997. Equine frozen semen freezability and fertility results. *Theriogenology* 48:907-917.
- Vidament M, Ecot P, Noue P, Bourgeois C, Magistrini M and Palmer E. 2000. Centrifugation and addition of glycerol at 22°C instead of 4°C improve post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa. *Theriogenology.* 54:907-919.
- Vidament M, Magistrini M, Le Foll Y, Levillain N, Yvon JM, Duchamp G and Blesbois E. 2012. Temperature from 4 to 15°C are suitable for preserving the fertilizing capacity of stallion semen stored for 22h or more in INRA96 extender. *Theriogenology* 78:297-307.