

## 희석액의 종류가 재래 흑염소 액상 정액의 생존율에 미치는 영향

김현중 · 최창용 · 최선호 · 손동수 · 최순호 · 상병돈 · 한만희 · 류일선 ·  
김인철 · 김일화<sup>1</sup> · 임경순<sup>2</sup> · 김성재 · 조상래<sup>†</sup>  
축산연구소

## Comparison of Diluents on Liquid Storage of Korean Native Goat Spermatozoa

H. J. Kim, J. Y. Choe, S. H. Choi, D. S. Son, S. H. Choi, B. D. Sang, M. H. Han,  
I. S. Ryu, I. C. Kim, I. H. Kim<sup>1</sup>, K. S. Im<sup>2</sup>, S. J. Kim and S. R. Cho<sup>†</sup>

National Livestock Research Institute

### SUMMARY

This study was to investigate the optimal short-term storage diluents for goat spermatozoa. Semen was collected with electro-ejaculation from two goats. The collected semen was diluted in BTS and centrifuged at 500 g for 5 minutes. The supernatant was discarded and diluted with BTS, Modena or Triladyl<sup>®</sup> and stored at 4 or 17°C for 8 days. The motility of spermatozoa in BTS and Modena stored at 4°C was rapidly decreased at day 1. The motility of spermatozoa in BTS at 17°C was decreased to 30~45% at day 2. In Modena at 17°C, the inappropriate motility for artificial insemination (AI) was reached at day 4. The spermatozoa stored in Triladyl<sup>®</sup> at 4 or 17°C were more viable and higher motility up to day 4. In conclusion, liquid storage of goat spermatozoa in Triladyl<sup>®</sup> at 4 or 17°C for 4 days showed permissible viability for AI.

(Key words: spermatozoa, liquid storage, motility, diluents, Korean native goat)

### 서 론

한국에서 사육되고 있는 염소의 주종은 흑염소로, 과거부터 약용 혹은 육용으로 사육되어왔다. 현재 국내에서 사육되고 있는 두수는 2005년 12월말로 522,534두이며, 사육 농가는 40,874호로 집계되고 있다(농림부, 2006). 농가 사육 규모는 유우나 한우, 돼지, 가금에 비해 상대적으로 적고 영세하다. 번식은 소나 돼지, 가금에서 인공수정이 널리 활용되는 것과는 달리 수십 마리의 암염소와 한 마리의 수컷을 합사하여 자연번식으로 이루어지고

있다. 인공수정이 활용되지 못하는 이유는 개체 사육 관리의 부담, 번식을 위한 추가 노동, 인공수정 비용, 자연번식에 비해 낮은 분만율 등이다. 그러나 최근 염소 사육 농가에서는 염소 유전 능력의 개량과 근친 교배의 극복, 농장간 수컷의 공유에서 유발되는 감염성 질병의 전파 차단을 위해 인공수정의 도입을 희망하고 있다.

인공수정에 정액을 보존하여 사용하는 방법으로 액상 정액으로 보존하는 방법과 동결 정액으로 보존하는 방법이 있는데, 동결 정액은 액체 질소에 침지된 상태로 반영구적으로 보존이 가능하나(Bolten

<sup>1</sup> 충북대학교 수의과대학(College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University)

<sup>2</sup> 서울대학교 동물자원과학과(Seoul National University)

<sup>†</sup> Correspondence : E-mail : jinsilro@rda.go.kr

등, 2005), 액상 정액의 보존 방법은 축종에 따라 인공수정에 이용할 수 있는 기간이 보고에 따라 다양하며, 길어도 1주일 이내로 보고되고 있다(소, Verberckmoes 등, 2005; 돼지, Johnsn 등, 2000; 염소, Peterson 등, 2006; 양, Salamon과 Maxwell, 2000). 돼지에서는 액상 정액이 동결 정액에 비해 높은 수태율을 기대할 수 있고 생산이 용이해 국내에서는 50여 군데의 민간 인공수정센터에서 주변 농가에 정액을 공급해 액상 정액으로 농가에서 활용되고 있는 실정인 반면, 한우에서는 국가 단위로 검정을 통해 우수한 개체를 선발하여 농협에서 동결 정액을 생산 공급하는 방식으로 인공수정이 활용되고 있다. 염소의 인공수정이 활성화 되고 있는 노르웨이에서는 수컷의 공유에 따른 질병 전파를 억제하기 위해 인공수정을 통한 번식을 유도하고 있는데, 지역 민간 인공수정센터를 활성화시켜 액상 정액 상태로 이용하고 있다(Paulenz 등, 2005). 반면 미국이나 호주 등에서는 우수 유산양을 선발하여 이들 정액을 동결보존하여 판매 및 인공수정에 활용하고 있어, 앞으로 우리나라의 염소 인공수정 산업의 방향이 어떤 방식으로 진행하는 것이 유리한지는 추후 검토가 필요할 것으로 생각된다. 현재 국내에서는 염소의 인공수정 기술 개발에 대한 연구가 상당히 미진한 상태로 기존의 흑염소의 개량과 앞으로 확대가 예상되는 유산양 산업에 이들 기술의 개발 및 보급이 필요하다고 하겠다.

염소의 정액을 액상으로 보존하는 방법으로 탈지유, Laiciphos<sup>®</sup>, BTS, Biociphos Plus<sup>®</sup> 희석액들이 보고되고 있으며(Paulenz 등, 2005), 정장에 포함된 egg yolk coagulating enzyme(EYCE)은 구요도선에서 분비되는 정장 물질의 하나로 phospholipase인데, 이 효소가 난황의 레시틴을 분해하여 독성 물질을 만들어 반드시 정장을 제거하는 것이 필요하다는 보고가 있으며(Leboeuf 등, 2000), 정장의 물질이 정액의 활력을 떨어뜨려 정액을 사출할 때 BSA가 첨가된 다량의 희석액에 바로 받아 정장 물질을 희석하고 정자막을 코팅하는 것이 정자의 활력 유지에 도움이 된다는 보고도 있다(Yamashiro 등, 2006). 본 연구에서는 정장을 제거하고 BTS, Modena, 난황이 첨가되지 않은 Triladyl<sup>®</sup> 희석액으로 액상 정액을 보존하여 보존 가능 기간에 대하

여 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시험축 및 정액 생산

시험축은 2살 이상된 재래 흑염소 수컷 2두를 선별하여 별도 공간에서 자유 급식하여 사육하였으며, 월 3~4회 정액을 채취하였다. 정액 채취는 충전식 전기 자극기(Model 66000-D, Nasco, 미국)의 염소 프로브에 소 직장 검사용 윤활제로 윤활시켜 직장에 삽입하여 부생식선 위 부분으로 추정되는 위치에 전극선이 위치되게 한 후 서서히 전압을 올려 5초간 유지하다 다시 전압을 0 상태로 낮추는 작업을 사정할 때까지 전압의 강도를 높여 가며 반복하여 정액을 채취하였다. 보통 3회 이내에 정액을 사출하였으며, 사출된 정액은 음경 말단부에 50 ml 튜브를 사전에 위치시켜 사출 정액을 회수하였으며, 회수된 정액은 요의 미혼입 여부를 육안으로 확인하여 우유빛 색깔과 운무상으로 평가하였다.

### 2. 희석액의 제조

희석액은 BTS, Modena, Triladyl<sup>®</sup> 3종을 Minutub(독일)에서 구입하여 사용하였으며, 희석액은 사용 설명서에 따라 제조하였으며, 단, Triladyl<sup>®</sup> 희석액은 설명서와 달리 난황을 첨가하지 않았다. 간단히 설명하면 BTS와 Modena는 1리터 단위 파우더 상태로 구입하였으며, 700 ml 가량의 이차 증류수에 파우더를 완전히 부어서 녹인 후 최종 1리터로 맞춰 필터 후 보관하며 사용하였으며, Triladyl<sup>®</sup> 희석액은 액상 상태로 구입하여 2차 증류수 30 ml에 Triladyl<sup>®</sup> 10 ml를 부어 섞은 후 사용하였다.

### 3. 정액 처리

사출 정액은 채취 즉시 37℃ 이동식 온장고에 넣어져 10분 이내에 실험실로 운반하였다. 정액의 품질은 현미경으로 운동성과 정자 형태에 의해 평가하였다. 정자들이 소용돌이치며 움직이고, 꼬리나 두부에 이상이 없음을 확인하여 두 개체 모두 활력을 90% 이상으로 평가하였다. BTS 희석액으로 채취 정액과 1:1 희석하여 500 g로 5분간 원심

분리하여 상층액을 제거하고 침전 부분을 6개의 튜브에 나누어 담고 BTS, Modena, Triladyl® 3종의 희석액 중 하나를 사용하여 희석하여 최종 농도가 ml 당 1억 개가 되게 희석하였다. 희석된 정액은 활력이 85%였으며, 이들을 처리별로 4℃ 냉장고와 17℃ 온장고 보관하면서 활력의 변화를 관찰하였다.

#### 4. 정자 운동성 평가

정자의 활력은 채취일부터 8일 동안 관찰하였으며, 4℃ 냉장고와 17℃ 온장고에서 꺼내어 일부를 분리하여 가온판에서 37℃까지 5분간 가온 후 광학현미경상에서 정자 운동성을 평가하였다. 혈구 계산판에 5 μl의 정액을 넣고 커버글라스를 덮은 후 100배율에서 정자의 운동성을 평가하고 200배율에서 삼투압 충격이나 저온 충격으로 발생할 수 있는 정자 꼬리 꺾임 등의 기형 변화가 발생되었는지 확인하였다. 혈구 계산판의 격자 2군데를 2명이 관찰하여 생존 정자 비율을 퍼센트로 나타내었다. 관찰되는 거의 모든 정자들이 소용돌이치며 활발하게 움직이는 것을 90% 이상으로, 생존 정자들

이 격자별로 100개 가량을 관찰하여 활발하게 움직이는 정자들이 80% 이상일 때 80%로, 70% 이상일 때 70% 등으로 보고, 50% 이하는 움직이는 정도가 전진 운동 혹은 느리게 전진 운동하는 수준이며, 20% 이하는 느리게 전진 운동하거나 진자 운동 혹은 미동하는 수준으로 평가하였다.

#### 결과 및 고찰

흑염소 정액을 액상으로 보존할 때 희석액 별 보존 기간에 따른 운동성의 변화는 Table 1에 나타나 있다. 최종 희석 후 활력은 85%였으며, BTS 희석액을 이용한 처리구에서 4℃ 냉장고에서 1일간 보관하였을 때 운동성이 완전히 소멸되었으며, 17℃ 온장고에서 보관하였을 때 1일째는 70%의 활력을 유지하였으나, 2일째에는 급격히 30~45%로 감소되어 6일째에는 완전히 소멸되었다. Modena 희석액을 이용한 처리구에서는 4℃ 냉장고에서 1일간 보관하여 35~45%로 활력이 급격히 감소되었으며, 17℃ 온장고에서 보관하였을 때는 3일째

Table 1. Effect of three different extenders on sperm motility following storage of two buck's liquid semen for 8 days

Diluent	Buck	Preservation temperature (°C)	Motility (%)									
			D*0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	
BTS	A	4	85	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		17	85	70	45	30	20	10	10	5	0	
	B	4	85	0	0	0	0	0	0	0	0	
		17	85	70	30	25	10	5	0	0	0	
Modena	A	4	85	35	40	40	30	25	25	20	20	
		17	85	80	75	75	65	55	50	20	20	
	B	4	85	45	45	45	35	35	35	35	35	
		17	85	80	75	45	35	25	20	5	5	
Triladyl®	A	4	85	75	70	70	60	50	40	40	40	
		17	85	80	70	75	70	65	60	55	50	
	B	4	85	65	65	65	65	55	50	50	45	
		17	85	75	60	65	65	60	60	55	50	

\* D is day.

에 개체에 따라 45~75%의 운동성으로 개체 간 보존성의 차이를 보였다. Modena 희석액은 검사 마지막인 8일째에도 4℃와 17℃ 모두에서 일부 정자 운동성이 남아 있었다. 반면 Triladyl® 희석액은 4℃와 17℃ 모두에서 4일까지 60~70%의 운동성을 보여 주었으며, 검사 마지막 날인 8일째에도 40~50%의 운동성을 유지하였다.

BTS는 돼지 액상 정액의 보존에 가장 많이 사용되는 희석액으로 glucose, sodium citrate, sodium bicarbonate, EDTA, potassium chloride로 구성되어 있다. 이 희석액은 단순한 구성물들로 이루어져 있으나 돼지 정액을 보존하는데 우수한 희석액으로 알려져 있다. 하지만, 염소 정액 보존에 이용할 때 4℃에서 보존하는 것은 적합하지 않았으며, 17℃에 보존하였을 때에도 하루 정도 인공수정에 적합한 활력을 유지할 수 있었다. 이 결과는 김 등(2002)의 돼지 정액을 17℃에서 7일간 보존하여 46.7%의 운동성을 보였다는 보고와는 차이가 나는 것으로, 축종간의 변이 때문으로 추정된다. 본 결과의 급속한 운동성의 저하는 17℃보다 4℃에서 사멸속도가 빠른 것으로 보아 저온 충격에 따른 것으로 생각되는데, 실제 BTS에는 세포막을 보호하여 저온 충격을 완충시켜 줄 수 있는 지질 성분이 포함되어 있지 않다.

Modena 역시 돼지 정액의 액상 보존에 널리 활용되는 희석액으로, glucose, sodium citrate, sodium bicarbonate, EDTA, citric acid, BSA, cysteine, Tris로 구성되어 있으며, BSA는 단백질원과 저온 충격을 완충해 주는 성분으로 알려져 있다. Yamashiro 등(2006)은 염소 정액을 채취할 때 5% BSA가 첨가된 10 ml 희석액으로 바로 희석하면 정액의 동결성이 높았는데, 이는 정자가 정자 동결에 나쁜 영향을 미치는 정장과 접촉할 시간을 적게 주면서 BSA가 세포막에 붙어 정자 세포막의 지방 조성을 변경시켜 세포막 단백질 가수분해를 촉진하며, 세포막내로 Ca<sup>2+</sup>의 유입을 증가시키고, 콜레스테롤과 인지질의 비율을 감소시켜 세포막의 유동성을 증가시켜 염소 정자의 저온 충격에 견디는 능력을 향상시키는 것으로 추측했다. 난황도 유사한 결과가 보고되었는데, 소의 정액을 채취할 때 Triladyl®에 20% 난황과 6.7%의 글리세롤이 첨가된 튜브로

채취한 후 바로 원심 분리하여 보관하여도 세포막과 침체막에 코팅 효과가 발생하여 정자의 보존성이 월등히 향상된다고 하였다(De Pauw 등, 2003). 그러나 Modena도 4℃에서 보존하였을 때 BTS보다는 나왔지만 빠르게 운동성이 감소하였으며, 17℃에서 보존하였을 때 인공수정이 가능한 활력을 2~3일간 유지할 수 있는 정도였다.

Triladyl®은 상업적으로 판매되는 합성 동결 보존액으로 소의 동결 보존을 위해 개발되었으며, 최근에는 양(Kasimanickam 등, 2006; Perez-Garnelo 등, 2005), 가젤(Garde 등, 2003), 유럽들소(Perez-Garnelo 등, 2006), 사슴(Esteso 등, 2003) 등 다른 축종이나 멸종 동물의 정액 동결 보존에 활발히 활용되고 있다. 상업적으로 판매되는 제품의 특성상 조성은 정확하게 알려져 있지 않으나, 동해 방지를 위해 비침투성 동해 방지제로 lactose가 들어 있으며, 침투성 동해 방지제로 glycerol이 첨가되어 있고, pH buffer로 Tris와 citric acid와 tylosin, spectinomycin, gentamycin, lincomycin의 네 가지 항생제가 포함된 것으로 알려져 있다(Garde 등, 2003). 이 동결 보존액에 난황을 첨가하지 않고 액상 정액의 희석액으로 활용한 보고는 아직까지 없으나, 본 실험에서 난황을 첨가하지 않고 사용하여 4℃와 17℃ 보존에 활용한 결과, 우수한 액상 정액 보존성이 확인되었으며, 이 희석액은 정자 운동성을 4일 동안 60~70% 수준으로 유지하였다. De Pauw 등(2003)은 소의 정액을 Triladyl® 희석액에 20% 난황과 6.7%의 글리세롤을 첨가하여 6일간 상온과 4℃에서 보존하였을 때 정자 운동성이 그대로 유지된 반면 Hapes-TALP에서는 급격하게 운동성이 저하되었다는 결과를 보고하여 본 실험의 Triladyl®과 다른 희석액간의 비교와 유사한 결과를 보여 주었다. 한편 Paulenz 등(2005)은 상온에서 염소 정액을 액상 보존할 때 BTS보다 우유를 이용하는 희석액(탈지유, Laiciphos®, Biochipos Plus®)이 유리하다고 보고하였다. 우유를 이용한 희석액에서 28시간 보존하여 50%의 운동성을 얻은 반면 BTS에서는 3시간 보존 후 정자의 운동성이 완전히 없어졌다고 하였으며, 이들 결과는 본 실험의 결과와 유사하였다. 또 양의 경우, Paulenz 등(2002)은 정액을 우유에 난황을 첨가한 희석액, sodium citrate

에 난황을 첨가한 희석액, Tris, fructose, citric acid 에 난황을 첨가한 희석액에 양의 정액을 5℃와 20℃로 보존하며 0, 6, 12, 24, 30시간 동안 정자의 활력을 관찰한 결과 Tris를 근거로 한 희석액이 두 가지 온도 모두에서 다른 희석액들보다 좋은 것으로 보고하였고, Hollinshead 등(2003)은 유세포 분리기를 이용하여 암수 정자를 분리한 후 6일간 5℃로 액상 보존했을 때 고온 열처리된 우유가 Tris에 난황을 첨가한 희석액이나, Androhep나 TEST buffer에 난황을 첨가한 희석액보다 정자 보존 활력이 좋았다고 보고하였다. 우유나 난황에는 인지질들을 함유되어 있는데, 이 물질은 저온 충격에 정자 세포막을 보호하는 역할을 한다고 알려져 있다. 염소의 정장에는 난황을 응결시키는 효소가 있어 염소 정액의 동결 보존을 위해서는 반드시 정장을 제거하여야 난황이 응결되어 정자 생존성의 저하를 막을 수 있다고 알려져 있고(Roca 등, 1997), 정장을 제거하지 않은 정액을 난황이 첨가된 희석액에서 보존했을 때 온도와 상관없이 응고됨을 확인하였다(미발표 자료). 양의 정액을 액상 보존한 연구들에서는 정장을 제거하지 않고 사용하였다. 본 실험에서는 염소 정액의 액상 보존에 난황을 첨가하지 않은 Triladyl<sup>®</sup>를 사용하여 4일 동안 인공수정이 가능한 활력을 유지할 수 있었다.

## 적 요

본 연구는 염소 액상 정액의 활용에 적합한 희석액을 검토하여, 국내 염소 인공수정 실용화를 위한 기초 자료를 확보하기 위하여 실시되었다. 두 마리의 흑염소 수컷으로부터 전기 자극법으로 정액을 채취하였다. 채취된 정액은 BTS로 희석하여 500g에서 5분간 원심분리하여 정장을 제거하고, BTS, Modena, Triladyl<sup>®</sup>로 희석하여 4℃ 냉장고나 17℃ 온장고에서 8일간 보관되었다. BTS와 Modena로 희석된 정자의 운동성은 하루 만에 소멸되었으며, BTS로 희석된 정액을 17℃에 보관하였을 때 2일째에 30~45%로 떨어졌으며, Modena에서는 3일째까지 인공수정에 가능한 활력을 유지하였다. 한편 Triladyl<sup>®</sup>로 희석하여 4℃나 17℃에서 보관한 경우에는 좀더 좋은 생존성을 나타내었으며, 4일

까지도 인공수정이 가능한 운동성을 보여주었다.

## 참고문헌

- Bolten M, Weissbach L and Kaden R. 2005. Cryopreserved human sperm deposits: usability after decades of storage. *Urologe A*, 44:904-908.
- De Pauw IMC, Van Soom A, Maes D, Verberckmoes S and de Kruijff A. 2003. Effect of sperm coating on the survival and penetrating ability of *in vitro* stored bovine spermatozoa. *Theriogenology*, 59:1109-1122.
- Esteso MC, Fernandez-Santos MR, Soler AJ and Garde JJ. 2003. Head dimensions of cryopreserved red deer spermatozoa are affected by thawing procedure. *Cryo Letters*, 24:261-268.
- Garde JJ, Soler AJ, Cassinello J, Crespo C, Malo AF, Espeso G, Gomendio M and Roldan ERS. 2003. Sperm cryopreservation in three species of endangered gazelles (*Gazella cuvieri*, *G. dama mhorr*, and *G. dorcas neglecta*). *Biol. Reprod.*, 69:602-611.
- Hollinshead FK, O'Brien JK, Gillan L, Meyers M, Maxwell WMC and Evans G. 2003. Liquid storage of flow cytometrically sorted ram spermatozoa. *Theriogenology*, 62:587-605.
- Johnson LA, Weitze KF, Fiser P and Maxwell WMC. 2000. Storage of boar semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 62:143-172.
- Kasimanickam R, Kasimanickam V, Pelzer KD and Dascanio JJ. 2006. Effect of breed and sperm concentration on the changes in structural, functional and motility parameters of ram-lamb spermatozoa during storage at 4℃. *Anim. Reprod. Sci.*, doi:10.1016/j.anireprosci.2006.09.001.
- Leboeuf B, Restall B and Salamon S. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.*, 62:113-141.
- Paulenz H, Soderquist L, Perez-Pe R and Andersen Berg K. 2002. Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid

- ram semen. *Theriogenology*, 57:823-836.
- Paulenz H, Soltun K, Adnoy T, Berg KA and Soederquist L. 2005. Effect of different extender on sperm viability of buck semen stored at room temperature. *Small Ruminant Research*, 59:89-94.
- Perez-Garnelo SS, Borque C, Madrid-Bury N, Delclaux M, Talavera C, Martinez E, Palasz AT and De La Fuente J. 2005. Basic characteristics and cryobanking of barbary sheep (*Ammotragus lervia*) semen. *Reprod. Fertil. Dev.*, 17:249-250.
- Perez-Garnelo SS, Oter M, Borque C, Talavera C, Delclaux M, Martinez-Nevado E, Palasz AT and De la Fuente J. 2006. Post-thaw viability of european bison (*Bison bonasus*) semen frozen with extenders containing egg yolk or lipids of plant origin and examined with a heterologous *in vitro* fertilization assay. *J. Zoo Wildl. Med.*, 37:116-125.
- Peterson K, Kappen MAPM, Ursem PJF, Nothling JO, Colenbrander B and Gadella BM. 2006. Microscopic and flow cytometric semen assessment of Dutch AI-bucks: Effect of semen processing procedures and their correlation to fertility. *Theriogenology*, doi:10.1016/j.theriogenology.2006.11.003.
- Roca J, Carrizosa JA, Campos I, Laufuente A, Vazquez JM and Martinez E. 1997. Viability and fertility of unwashed Murciano-Granadina goat spermatozoa diluted in Tris-egg yolk extender and stored at 5°C. *Small Ruminant Research*, 25:147-153.
- Salamon S and Maxwell WM. 2000. Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 62:77-111.
- Verberckmoes S, Van Soom A, Dewulf J and de Kruif A. 2005. Comparison of three diluents for the storage of fresh bovine semen. *Theriogenology*, 63:912-922.
- Yamashiro H, Wang H, Yamashita Y, Kumamoto K and Terada T. 2006. Enhanced freezability of goat spermatozoa collected into tubes containing extender supplemented with bovine serum albumin (BSA). *J. Reprod. Dev.*, 52:407-414.
- 김인철, 이장희, 김현종, 박창식. 2002. 돼지 액상 정액의 보존액, 보존온도 및 기간이 정액성상과 번식성적에 미치는 영향. *한국가축번식학회지*, 26:9-16.
- 농림부. 2006. 2005년 기타가축통계. 행정간행물 등록번호 11-1380000-001001-10.

---

(접수일: 2006. 12. 13 / 채택일: 2006. 12. 27)