

Glucose, SOD, Catalase 첨가가 돼지 수정란의 체외발생에 미치는 영향에 관한 연구

김상근 · 이명현 · 남윤이* · 김무강

충남대학교 수의과대학

Effects of Glucose, SOD and Catalase Levels During the *In Vitro* Culture in Medium on *In Vitro* Developmental Rates of Porcine Oocytes

Kim, S. K., M. H. Lee, Y. Y. Nam* and M. K. Kim

College of Vet. Med., Chungnam National Univ.

SUMMARY

The study was conducted to determine the optimal glucose, superoxide dimutase(SOD) and catalase levels during the *in vitro* culture of porcine oocytes matured and fertilized *in vitro* for morulae and blastocyst development. Oocytes were cultured for 0~8 days in TCM-199 medium supplemented with 20% FCS, different glucose, SOD and catalase levels.

The results are summarized as follows ;

1. The *in vitro* developmental rates of porcine oocytes cultured in TCM-199 medium containing 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 3.0 mM glucose levels 0~3 and 0~8 days after insemination were 22.8, 24.2, 21.9, 20.0, 12.1 and 21.9, 26.7, 25.0, 22.6, 16.7%, respectively.
2. The *in vitro* developmental rates of porcine oocytes cultured in TCM-199 medium containing 100, 200, 300, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SOD levels 0~3 and 0~8 days after insemination were 16.7~23.3 and 16.7~25.0%, respectively. High levels of SOD(500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) significantly reduced the rates of morulae and blastocysts stage($P<0.05$).
3. The *in vitro* developmental rates porcine oocytes cultured in TCM-199 medium containing 100, 200, 300, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ catalase levels 0~3 and 0~8 days after insemination were 18.8~26.7 and 19.4~28.1%, respectively. and there was significant differences on the development to the morulae and blastocysts stage among the cumulus cells and glucose levels.

Key word : glucose, SOD, catalase, *in vitro* developmental rates

I. 서 론

체외수정란은 동물종에 따라 *in vitro* block이라는 작용이 있어서 발생과정중 발생이 정지되는 현상이 있다. 이것은 초기배의 배양에서 glucose, glutamine,

pyruvic acid 등의 기초적 에너지 부족 또는 과잉이 원인으로 알려져 있는데, Legge와 Sellens(1991)는 마우스 배의 2 cell block은 free radical인 과산화수소가 원인이라고 보고하였다.

초기배의 배양에서 glucose 등의 에너지를 취한 후 사립체에서 전자전달계의 산소분자가 증가하고 결과

* 한국과학기술원 생명공학연구소(Res. Insti. Biosci. and Biotech., KIST)

적으로 free radical인 super oxide(O_2^-)가 생성된다. 방출된 O_2^- 는 세포내의 방어기구에 의해 과산화수소로 변환되지만 그 때의 불균화 산소로서 SOD가 작용하여 특히 과산화수소를 물과 산소로 변환시키는 효소로서 생체내에서는 glutathione, peroxidase(G-PX), catalase 등이 작용한다. 그러나 세포내의 과산화수소는 금속과 결합함에 따라서 급속히 penton 반응을 일으키고 hydroxyradical 반응성은 극히 높아 지질의 과산화를 일으키고, 단백질합성의 저해, 세포막 파괴 등의 강한 세포장해를 일으킨다(Puglia와 Powell, 1984).

Glucose대사는 소 수정란의 2 cell로부터 배반포기에 현저히 증가되며, 16세포기까지는 배의 glucose 이용율이 낮지만 상실배에서는 급격히 상승하고 배반포, 확장배반포 및 hatching 배반포에서는 glucose 이용율이 높다고 보고하였다(Rose와 Bavister, 1992; Tiffin 등, 1991; Javed와 Wright, 1991). Gardner와 Leese(1990)는 소 수정란의 난구세포는 glucose를 소비하여 pyruvic acid를 생산한다고 보고하였으며, Lu 등(1988), Goto 등(1988) 및 Fukuda 등(1990)은 소 난포란을 이용하여 난관상피세포와 공배양에 의해 상실배 또는 배반포를 성공적으로 생산하였다고 보고하였다. 한편, Takahashi와 First(1992)는 TCM-199 배양액에 함유되어 있는 5.56 mM의 glucose 농도는 초기배의 발생을 저해한다고 보고하였다.

대부분의 연구자들이 사용한 배양액은 3~5 mM 농도의 glucose 수준과 1.5 mM만의 SOFM (synthetic oviduct fluid medium)으로 배양한 성적이었다(Flood와 Wiebold, 1988; Seshagiri와 Bavister, 1989). 그러나 glucose의 첨가는 배반포의 발생을 증가(Betterbed와 Wright, 1985; 김과 이, 1994) 또는 억제(Seshagiri와 Bavister, 1989; Schini와 Bavister, 1988; Ellington 등, 1990)한다고 보고하였다. 이에, 본 연구는 돼지 수정란의 체외수정과 체외발생에 미치는 영향을 구명하기 위하여 배양액에 적정 glucose, SOD, catalase 첨가수준을 구명하고자 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재 료

1) 난포란과 배양액

도살자돈으로부터 난소를 적출하여 100 IU/ml의 penicillin G와, 100 μ g/ml의 streptomycin sulfate를 첨가한 38°C의 생리식염수에 침지하여 실험실로 옮겨 주사기로 난포액을 흡입하여 petri dish에 채취한 후 실체현미경(20 \times) 하에서 형태적으로 우수한 난포란을 선별하여 회수하였다.

TCM-199(Whittaker, M.A. Bioproducts Co., USA)를 기본 배양액으로 하여 배양액에 20%(v/v)의 FCS(Sigma Co., USA)와 penicillin G 및 100 μ g/ml의 streptomycin sulfate(Sigma Co., USA)를 첨가하여 이용하였다.

2) Glucose, SOD, catalase

20% FCS + TCM-199 배양액에 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 3.0 mM의 glucose(Sigma Co., USA)와 100, 200, 300, 500 μ g/ml의 SOD(Sigma Co., USA)와 5, 10, 20, 30, 50 μ g/ml의 catalase(Sigma Co., USA)를 배양액에 첨가하여 수정 0~3일 및 4~8일간 배양하였다.

2. 방 법

1) 난포란의 체외성숙

난포란의 체외성숙은 회수한 난포란을 배양액으로 3회 세척한 후 난포란을 45 μ l의 배양액 소적당 5개의 난포란을 주입하고 mineral oil로 피복하여 20~24시간 동안 성숙배양하였다.

2) 난포란의 체외수정

난포란의 체외수정은 성숙배양이 끝난 난포란을 45 μ l의 배양액 소적에 5개씩 주입하고, 정소상체 미부정액 0.2 ml와 다정자침입 방지를 위해 10%의 PFF가 첨가된 BO액 1 ml에 시험관내에서 혼합하여 CO₂ 배양기에서 swim-up시킨 다음, 약 0.5ml의 상층액을 1,500 rpm으로 10분간 원심분리한 후 침전된 정자 pellets을 동량의 heparin 용액(100 μ g/ml, Sigma Co., USA)과 함께 혼합하여 CO₂ 배양기에서 수정능획득을 유기시킨 정자부유액 2 μ l(1~5 \times 10⁶ml)을 주입하고 mineral oil로 피복한 후 38°C의 CO₂ 배양기에

서 5~7시간 동안의 매정에 의해 수정시켰다.

3) 수정 및 생존성의 판정

수정의 판정은 수정란을 배양액으로 배양하면서 상실배 또는 배반포로의 발생상태를 관찰하여 판정하거나, Shea 등(1976)과 Ball 등(1984)의 방법을 병행하였으며, 생존성의 판정은 Schilling 등(1982)의 FDA(fluorescence diacetate) test에 의해 형광현미경하에서 판정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. Glucose첨가에 따른 체외발생율

1) 수정 0~3일째 첨가에 따른 체외발생율

수정 0~3일째에 각 수준의 glucose를 TCM-199 배양액에 첨가하여 배양하였을 때 돼지 수정란의 체외발생율은 Table 1과 같다.

수정일로부터 3일에 배양액내 0.1, 0.3, 0.5 mM의 glucose를 첨가하여 배양하였을 때 체외발생율은 각각 22.8, 24.2, 21.9%였다. 한편, 배양액내 1.0, 3.0 mM의 glucose를 첨가하여 배양하였을 때 각각 20.0, 12.1%로서 glucose를 첨가하지 않은 대조군보다 높은 체외발생율을 나타냈다. 0.3 mM의 glucose 첨가가 다른 glucose 농도의 첨가보다 높은 체외발생율을 나타냈다.

이러한 결과는 대상동물은 다르지만, Matsuyama 등(1993)의 소 난포란의 체외배양시 0.188 mM의 glucose를 0~3일에 첨가하여 배양하였을 때 가장 높은 분할율과 배반포로의 발생율을 나타냈다는 보고와

거의 일치하였다. 한편 Javed와 Wright(1991)는 소 배에서 16세포기까지는 배의 glucose 이용은 낮지만 상실배에서는 급격히 상승하고 배반포, 확장배반포 및 부화 배반포에서 glucose 효과가 높다고 하였다. Funahashi와 Day(1993)는 돼지 난포란의 체외수정시 다정자침입을 줄이기 위해 10%의 BFF(porcine follicular fluid)와 BSA를 첨가하여 전배양했을 때 54와 68%의 단정자침입율을 나타냈다고 보고한 바 있어 체외발생율의 향상이라는 측면에서 고려해 볼 과제로 판단된다.

2) 수정 4~8일째 첨가에 따른 체외발생율

수정 4~8일째에 각 수준의 glucose를 TCM-199 배양액에 첨가하여 배양하였을 때 돼지 수정란의 체외발생율은 Table 2와 같다.

수정 4일로부터 8일에 배양액내 0.1, 0.3, 0.5 mM의 glucose를 첨가하여 배양하였을 때 체외발생율은 각각 21.9, 26.7, 25.0%였으며, 배양액내 1.0, 3.0 mM의 glucose를 첨가하여 배양하였을 때 각각 22.6, 16.7%로서 glucose를 첨가하지 않은 대조군보다 유의한 높은 체외발생율을 나타냈다($P < 0.05$). 0.3 mM의 glucose 첨가가 다른 glucose 농도의 첨가보다 높은 체외발생율을 나타냈다.

이러한 결과는 Matsuyama 등(1993)의 소 난포란을 이용하여 SOFM 배양액에 0.188 mM의 glucose를 배양일로부터 3일에 첨가하였을 때 가장 높은 분할율과 배반포로의 발생율을 나타냈다는 보고와 비교할 때 약간의 차이가 있었다. Takahashi와 First(1992)는 TCM-199 배양액에 첨가한 5.56 mM의 glucose 농도는 초기배의 발생을 저해한다고 하였다.

Table 1. Effects of glucose levels in TCM-199 medium(days 0 to 3) on *in vitro* development of *in vitro* fertilized porcine oocytes

Concentration of glucose(mM)	No. of oocytes cultured	No. of oocytes fertilized	No. of Morulae & blastocyst
Cont.	29	22(75.9)	5(17.2)
0.1	35	27(77.1)	8(22.8)
0.3	33	25(75.8)	8(24.2)
0.5	32	24(75.0)	7(21.9)
1.0	30	22(73.3)	6(20.0)
3.0	33	24(72.7)	4(12.1)

Table 2. Effects of glucose levels in TCM-199 medium(days 4 to 8) on *in vitro* development of *in vitro* fertilized porcine oocytes

Concentration of glucose(mM)	No. of oocytes cultured	No. of oocytes fertilized	No. of Morulae & blastocyst
Cont.	29	22(75.9)	5(17.2) ^a
0.1	32	24(75.0)	7(21.9)
0.3	30	23(76.7)	8(26.7) ^b
0.5	32	23(71.9)	8(25.0) ^b
1.0	31	24(77.4)	7(22.6)
3.0	30	22(73.3)	5(16.7)

^{a,b} : P<0.05

2. SOD첨가에 따른 체외수정율과 체외발생율

1) 수정 0~3일째 첨가에 따른 체외발생율

수정 0~3일째에 각 수준의 SOD를 TCM-199 배양액에 첨가하여 배양하였을 때 돼지 수정란의 상실배 및 배반포로의 체외발생율은 Table 3과 같다.

수정일로부터 3일에 배양액내 100, 200, 300, 500 μ g/ml의 SOD를 첨가하여 배양하였을 때 체외발생율은 각각 21.9, 23.3, 21.2, 16.7%로서 유의한 배 발생의 촉진효과는 인정되지 않았으며, 고농도의 SOD첨가는 유의한 감소를 나타내어 배 발생이 저해되는 경향이였다. 이러한 결과는 McCord와 Fridovich 등(1969)에 의해 SOD가 발견된 후 Umaoka 등(1992)이 마우스배 발생을 유의하게 촉진시킨다는 보고와 비교할 때 상이하지만 이는 동물종간의 차이로 판단되며, 아울러 과잉의 SOD는 발생과정중 catalase가 H₂O₂를 처리하지 못해 배 발생을 저해하는 것으로 판단된다.

초기배의 배양에서 glucose 등의 에너지를 취한 후 사립체에서 전자전달계의 산소분자가 증가하고 결과적으로 free radical인 super oxide(O₂⁻)가 생성된다. 방출된 O₂⁻는 세포내의 방어기구에 의해 과산화수소로 변환되지만 그 때의 불균화산소로서 SOD가 작용하여 특히 과산화수소를 물과 산소로 변환시키는 효소로서 생체내에서는 glutathione, peroxidase (GPX), catalase 등이 작용한다. 그러나 세포내의 과산화 수소는 금속과 결합함에 따라서 급속히 penton 반응을 일으키고 hydroxyradical 반응성은 극히 높아 지질의 과산화를 일으키고, 단백질합성 저해, 세포막 파괴 등의 강한 세포장해를 일으킨다(Puglia와 Powell, 1984).

2) 수정 4~8일째 첨가에 따른 체외발생율

수정 4~8일째에 각 수준의 SOD를 TCM-199 배양액에 첨가하여 배양하였을 때 돼지 수정란의 상실배 및 배반포로의 체외발생율은 Table 4와 같다.

수정 4일로부터 8일에 배양액내 100, 200, 300, 500

Table 3. Effects of SOD levels in TCM-199 medium(days 0 to 3) on *in vitro* development of *in vitro* fertilized porcine oocytes

Concentration of SOD(μ g / ml)	No. of oocytes cultured	No. of oocytes fertilized	No. of Morulae & blastocyst
Cont.	30	22(73.3)	5(16.7)
100	32	23(71.9)	7(21.9)
200	30	24(80.0)	7(23.3)
300	33	23(69.7)	7(21.2)
500	30	22(73.3)	4(16.7)

Table 4. Effects of SOD levels in TCM-199 medium(days 4 to 8) on *in vitro* development of *in vitro* fertilized porcine oocytes

Concentration of SOD(μg /ml)	No. of oocytes cultured	No. of oocytes fertilized	No. of Morulae & blastocyst
Cont.	30	22(73.3)	5(16.7) ^a
100	30	23(76.7)	7(23.3)
200	32	24(75.0)	8(25.0) ^b
300	30	24(80.0)	7(23.3)
500	30	22(73.3)	5(16.7)

^{a,b} : P<0.05

μg /ml의 SOD를 첨가하여 배양하였을 때 체외발생율은 각각 23.3, 25.0, 23.3, 16.7%로서 대조군에 비해 유의한 배 발생의 촉진효과가 인정되었으며(P<0.05), 고농도의 SOD첨가는 체외발생율의 감소를 나타냈다. 이러한 결과는 수정 0~3일째의 SOD를 첨가하여 배양하였을 때의 체외발생율과 유사한 경향으로서 유의한 배 발생 촉진효과는 인정되지 않았다. SOD에 의해 배 분할율이 향상되는 것은 catalase와 함께 효소적으로 작용하여 cell block현상을 제거한다고 보고하고 있다(Matsuyama와 Fukui, 1994).

3. Catalase첨가에 따른 체외수정율과 발생율

1) 수정 0~3일째 첨가에 따른 체외발생율

수정 0~3일째에 각 수준의 catalase를 첨가한 TCM-199 배양액에서 배양하였을 때 돼지 수정란의 체외발생율은 Tabel 5와 같다.

수정일로부터 3일에 배양액내 5, 10, 20, 30, 50 mM의 catalase를 첨가하여 배양하였을 때 체외발생

율은 각각 21.9, 26.7, 25.0, 23.3, 18.8%로서 유의한 배발생의 촉진효과를 나타냈다(P<0.05). 이러한 결과는 Matsuyama 등(1993)의 소 난포란을 이용하여 SOFM 배양액에 0.188 mM의 glucose를 배양일로부터 3일에 첨가하였을 때 가장 높은 분할율과 배반포로의 발생율을 나타냈다는 보고와 거의 일치하였다. 한편 Javed와 Wright(1991)는 소 배에서 16세포기까지는 배의 glucose 이용은 낮지만 상실배에서는 급격히 상승하고 배반포, 확장배반포 및 부화 배반포에서 glucose 효과가 높다고 하였으며, Takahashi와 First(1992)는 TCM-199 배양액에 첨가한 5.56 mM의 glucose 농도는 초기배의 발생을 저해한다고 하였다.

2) 수정 4~8일째 첨가에 따른 체외발생율

수정 4~8일째에 각 수준의 catalase를 첨가한 TCM-199 배양액에서 배양하였을 때 돼지 수정란의 체외발생율은 Table 6과 같다.

수정 4일로부터 8일에 5, 10, 20, 30, 50 mM의 catalase를 배양액에 첨가하여 배양하였을 때 체외발생율

Table 5. Effects of catalase levels in TCM-199 medium(days 0 to 3) on *in vitro* development of *in vitro* fertilized porcine oocytes

Concentration of catalase(μg /ml)	No. of oocytes cultured	No. of oocytes fertilized	No. of Morulae & blastocyst
Cont.	30	22(73.3)	5(16.7)
5	32	23(71.9)	7(21.9)
10	30	24(80.0)	8(26.7) ^a
20	32	25(78.1)	8(25.0)
30	30	22(73.3)	7(23.3)
50	32	23(71.9)	6(18.8) ^b

^{a,b} : P<0.05

Table 6. Effects of catalase levels in TCM-199 medium(days 4 to 8) on *in vitro* development of *in vitro* fertilized porcine oocytes

Concentration of catalase(μg /ml)	No. of oocytes cultured	No. of oocytes fertilized	No. of Morulae & blastocyst
Cont.	30	22(73.3)	5(16.7)
5	33	24(72.7)	8(24.2)
10	30	22(73.3)	8(26.7)
20	32	23(71.9)	9(28.1)
30	30	24(80.0)	7(23.3)
50	31	22(71.0)	6(19.4)

은 각각 24.2, 26.7, 28.1, 23.3, 19.4%로서 배 발생의 촉진효과가 인정되었다. 이러한 결과는 시험동물은 다르지만 Matsuyama 등(1993)은 소 난포란을 이용하여 SOFM 배양액에 0.188 mM의 glucose를 배양일로부터 3일에 첨가하였을 때 가장 높은 분할율과 배반포로의 발생율을 나타냈으나, 수정 후 0~3일에 높은 glucose 농도(3.0~5.0 mM)의 첨가는 배반포로의 발생율을 나타냈다는 보고와 대체로 일치하였다. Li 등(1993)은 catalase를 수정란내에 주입함에 따라 H₂O₂ 소거에 효과가 있다고 보고하였는데, 이는 배양액중에 첨가한 catalase가 배(embryos)내 또는 배양액중에서 발생한 H₂O₂는 쉽게 세포막을 통과하는 것이 가능하여 직접 영향을 미치는 것으로 판단된다.

IV. 적 요

본 연구는 돼지 수정란의 체외수정과 체외발생에 미치는 영향을 구명하기 위하여 20% FCS + TCM-199 배양액에 필요한 적정 glucose, SOD 및 catalase 첨가수준을 구명하고자 본 시험을 수행하였다.

1. 수정 0~3일 및 4~8일째에 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 3.0 mM의 glucose를 TCM-199 배양액에 첨가하여 배양하였을 때, 체외발생율은 22.8, 24.2, 21.9, 20.0, 12.1 및 21.9, 26.7, 25.0, 22.6, 16.7%였다.
2. 수정 0~3일 및 4~8일째에 100, 200, 300, 500 μg /ml의 SOD를 TCM-199 배양액에 첨가하여 배양하였을 때, 체외발생율은 각각 16.7~23.3 및 16.7~25.0%로서 고농도의 SOD첨가는 유의한 체외발생율의 감소를 나타냈다($P < 0.05$).

3. 수정 0~3일 및 4~8일째에 100, 200, 300, 500 μg /ml의 catalase를 TCM-199 배양액에 첨가하여 배양하였을 때, 체외발생율은 각각 18.8~26.7 및 19.4~28.1%로서 무첨가 대조군에 비해 유의한 증가를 나타냈다.

V. 인용문헌

1. Ball, G. D., M. L. Leibfried, R. L. Ax and N. L. First. 1984. Maturation and fertilization of bovine oocytes *in vitro*. J. Dairy Sci., 67: 2775-2785.
2. Betterbed, B. and R. W. Jr. Wright. 1985. Development of one cell ovine embryos in two culture media under two gas atmosphere. Theriogenology, 23:547-553.
3. Ellington, J. E., E. W. Carney, P. B. Farrell, M. E. Simkin and R. H. Footh. 1990. Bovine 1~2 cell embryo development using a simple medium in three oviduct systems. Biol. Reprod., 43:97-104.
4. Flood, M. R. and J. R. Wiebold, 1988. Glucose metabolism by preimplantation pig embryos. J. Reprod. Fert., 84:7-12.
5. Fukuda, Y., M. Ichikawa, K. Naito and Y. Toyoda. 1990. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured fertilized and cultured with cumulus cell *in vitro* on to the blastocyst stage. Biol. Reprod., 42: 114-119.

6. Funahashi, H. and B. N. Day. 1993. Effects of follicular fluid at fertilization *in vitro* on sperm penetration in pig oocytes. *J. of Reprod. and Fert.*, 99:97-103.
7. Gardner, D. K. and H. J. Leese. 1990. Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 88:361-368.
8. Goto, Y., Y. Kajihara, Y., S. Kosaka, M. Koba, Y. Nakanishi and K. Ogawa. 1988. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* fertilization of *in vitro* matured follicular oocytes. *J. Reprod. Fert.*, 83:753-758.
9. Javed, M. H. and R. W. Wright. 1991. Determination of pentose phosphate and Embden-Meyerhof pathway activities in bovine embryos. *Theriogenology*, 35:1029-1037.
10. Leege, M. and M. H. Sellens. 1991. Free radical scavengers ameliorate the 2-cell block in mouse embryo culture. *Human Reprod.*, 6:867-871.
11. Li, J., R. H. Foote and M. Simkin. 1993. Development of rabbit zygotes cultured in protein-free medium with catalase, taurin, or superoxide dismutase. *Biol. Reprod.*, 48:33-37.
12. Lu, K. H., I. Gordon, M. Gallagher and H. McGovern. 1988. Birth of twins after transfer of cattle embryos produced by *in vitro* techniques. *Vet. Rec.*, 122:539-540.
13. McCord, J. M. and I. Fridovich. 1969. Superoxide dismutase. *J. Reprod. Chem.*, 244: 6049-6055.
14. Matsuyama, K., H. Miyakoshi and Y. Hukui. 1993. Effect of glucose levels during the *in vitro* culture in synthetic oviduct fluid medium on *in vitro* development of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology*, 40:595-605.
15. Matsuyama, K. and Y. Fukui. 1994. Effects of oxygen concentration and free-radical scavengers on the *in vitro* development of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *J. Reprod. Devel.*, 40:73-79.
16. Puglia, C. D. and S. R. Powell. 1984. Inhibition of cellular antioxidants : A possible mechanism of toxic cell injury. *Environ Health Perspect.*, 57:307-311.
17. Rose, T. A. and B. D. Bavister. 1992. Effect of oocyte maturation on *in vitro* fertilized bovine embryos. *Mol. Reprod.*, 31:71-77.
18. Schini, S. A. and B. D. Bavister. 1988. Two cell block to development of cultured hamster embryos in caused by phosphate and glucose. *Biol. Reprod.*, 39:1183-1192.
19. Schilling, E., H. Niemann and D. Schmidt. 1982. Evaluation of fresh and frozen cattle embryos by fluorescence microscopy. *Cryobiology*, 15:245-248.
20. Seshagiri, P. B. and B. D. Bavister. 1989. Glucose inhibits development of hamster 8 cell embryos *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 40:599-616.
21. Shea, B. F., J. P. A. Latour, K. N. Berdin and R. D. Baker. 1976. Maturation *in vitro* and the subsequent fertilizability of extra follicular bovine oocytes. *J. Anim. Sci.*, 43: 809-815.
22. Takahashi, Y. and N. L. First. 1992. *In vitro* development of bovine one-cell embryos: Influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology*, 37:963-978.
23. Tiffin, G. J., K. J. Betteridge, B. R. Yadav and W. A. King. 1991. Glucose and glutamin metabolis in pre-attachment cattle embryos in reaction to sex and stage of development. *J. Reprod. Fert.*, 93:125-132.
24. Umaoka, Y., Y. Noda, K. Narimoto and T. Mori. 1992. Effect of oxygen toxicity on early development of mouse embryos. *Mol. Re-*

prod. Devel., 31:28-33.
25. 김상근, 이명현. 1994. 돼지 수정란의 체외수정 및

발생에 미치는 호르몬 및 glucose 첨가에 영향에
관한 연구. 한국수정란이식학회지, 9(3):235-241.