

돼지인공수정용 정액액상보존제 Kp의 개발에 관한 연구

I. Kp의 pH조절과 냉동정자에 의한 보존성 검정

김선의 · 정구민 · 서동삼 · 김득중 · 김인철* · 김현종* · 신영수** · 임경순***

한국생명과학연구소

A Study on Development of Boar Semen Extender Kp for Swine AI

I. Stabilization of pH Change and *In Vitro* Survival of Frozen-Thawed Boar Sperm in Kp Extender

Kim, S. E., K. M. Chung, D. S. Seo, D. J. Kim, I. C. Kim*, H. J. Kim*, Y. S. Shin** and K. S. Im***

Hankook Life-Science Institute

SUMMARY

Boar semen extender Kp (Hankook Life-Science, Korea) was newly formulated by authors. This study was carried out to investigate the optimal concentrations of EDTA, Tris and citrate buffers in the Kp extender (Basic Kp) on the pH change during storage. And then the motility of boar sperm with the Kp pH stabilized (Modified Kp) was compared with those of commercial products imported into Korea such as BTS (Mini-tube, Germany; BTSg), BTS (Tri-bio, USA; BTSa) and Modena (SGI, USA).

The pH values of all extenders were increased gradually with the storage days. Especially, the initial pH of Basic Kp was higher than that of BTSg, BTSa and Modena, and also higher than physiological pH of boar sperm (6.8~7.5). When Basic Kp was added with various concentrations of EDTA (0, 0.63, 1.25 & 2.37g/L), Tris (0, 0.18, 0.35, 0.71 & 1.42g/L) and Citrate (0, 0.75, 0.81, 1.00, 1.25 & 1.50g/L) buffers for pH down-regulation and stabilization of pH, the group added with 1.25g EDTA, 1.42g Tris and 1.00g Citrate well maintained the neutral range of pH during storage (6.88 at day1 to 7.33 at day6 in Modified Kp). Especially, the concentrations of the buffers added in Modified Kp were lower, until 1/2~1/4 ranges, than those in Modena and other extenders. The motility of frozen-thawed boar sperm diluted with Modified Kp was significantly higher than that of Basic Kp, BTSg, BTSa and Modena (87.0% vs. 55.0~71.0% at day1; 13.3% vs. 0~6.3% at day6).

Conclusively, Modified Kp in this experiment was kept the favorable physiological conditions in spite of low concentrations of the buffers and motility of frozen-thawed boar sperm was obtained better than that of Basic Kp and other commercial products such as BTSg, BTSa and Modena.

(Key words : Extender, pH, Kp, BTS, Modena, EDTA, Tris, Citrate, Sperm motility)

* 축산기술연구소 종축개발부 (National Livestock Research Institute, R.D.A.)

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

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

I. 서 론

최근 국내에서 돼지 인공수정이 활성화되고 있지만, 인공수정용 회석제는 대부분 수입에 의존하므로 막대한 외화낭비를 초래하고 있다. 이 시점에서 본 연구는 경제적인 측면과 정자생리적인 측면을 고려하여 독자적인 회석제 개발을 시도하였다. 특히, 본 연구는 독자 개발한 회석액(Kp)의 pH를 안정화시키는데 그 초점을 맞추었다. pH를 안정화시키기 위하여 EDTA, Tris 및 Citrate buffer를 농도별, 단계별로 첨가하여 Kp회석액의 pH변화와 정자의 생존율을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 설계

본 연구는 실험 1, 2 및 3으로 나누어 수행하였다. 실험 1은 Kp(한생연 제조; 이하 Basic Kp)와 BTS(Mini-tube, 독일; 이하 BTSg), BTS(Tri-bio, 미국; 이하 BTSa) 및 Modena(SGI, 미국)를 제조한 후 17℃에서 6일 동안 보존하면서 pH의 변화와 이들 회석액을 원정액과 혼합하였을 때 pH의 변화를 각각 비교하였다. 실험 2는 실험 1에서 Basic Kp의 initial pH를 정액의 생리적인 수준까지 하향조정하고, 보존 경과일에 따른 pH 변화폭을 줄이고자 3종류의 완충제를 농도별로 첨가하여 적정 수준의 pH를 결정하였다. 실험 3은 실험 2에서 결정된 각 완충제의 적정농도로 만들어진 재조정된 Kp회석액(Modified Kp)과 Basic Kp, BTSa, BTSg, Modena 회석액을 냉동정액과 회석하여 정자의 생존율에 미치는 효과를 살펴보았다.

2. 돼지 인공수정용 회석액의 제조 및 pH의 변화 측정

회석액 Kp는 sodium bicarbonate, fructose, cysteine, sodium citrate, caffeine과 완충제로 구성하였다. 한편 BTS와 Modena에는 sodium bicarbonate, glucose, sodium citrate, EDTA 및 항생제가 공통으로 첨가되어 있으며, BTS에는 KCl, Modena에는 Tris, Citrate, BSA가 별도로 첨가되었다. 각각의 회석제 분말은 Milli-Q PF⁺ water(Millipore, 미국)에 녹여, 0.22 μ m micro-fliter(Millipore,

미국)로 여과하여 실험에 사용하였다. Basic Kp의 pH를 안정화시키기 위하여 EDTA(0, 0.63, 1.25, 2.37g/L), Tris(0, 0.35, 0.71, 1.42g/L) 및 Citrate(0, 0.75, 0.81, 1.00, 1.25, 1.50g/L)를 각각 단계별로 첨가하여 그 적정수준을 시험하였다. 각 회석액은 17℃ 돼지정액액상보관고(Cason, 한국)에서 6일간 보존하면서 매일 pH를 측정하였다.

3. 정자의 준비 및 운동성 검사

각 회석제가 정자 생존성에 미치는 효과를 조사하기 위하여 동결정액(축산연 종축개량부 제조)을 사용하였다. 동결정액은 37℃ 항온수조에서 20초간 녹였으며, 정자의 농도와 활력에 따라서 회석배율을 결정하였다. 1차로 정액과 회석액을 1:1로 희석하였으며, 3회에 걸쳐 최종 회석배율이 8~10배까지 희석한 후 17℃에서 6일동안 보존하였다. 정자의 생존성은 매일 같은 시간에 정액 중 일부(10 μ l)를 혈구계산판에 적하하여 37℃로 가온 후 광학현미경(Olympus, 일본)에서 200배와 400배로 관찰하였다. 생존한 정자의 비율은 백분율로 산정하였다.

4. 통계처리

모든 실험은 3반복 이상 실시하였으며, 실험 중 pH 변화에 대한 결과는 반복수에 따른 표준편차를 계산하였다(실험 시작 일을 day 1로 함). 정자의 생존율은 SAS Institute software packge (SAS Institute Inc., 1985)를 이용하여 Duncan's Multiple Range Test로 유의차 검정을 실시하였다.

III. 결 과

1. 돼지 인공수정용 회석액의 17℃ 보존중 pH 변화 비교

Basic Kp와 BTSg, BTSa, Modena를 17℃ 보관고에서 6일간 보존하였을 때 pH의 변화는 Table 1과 같다. 모든 회석액은 보존일수가 경과할수록 pH가 높아졌지만, Modena가 다른 회석제보다 pH의 변화폭이 가장 작았다. 반면에 Basic Kp의 pH 변화폭은 BTSg와는 비슷하였지만 initial pH가 다른 회석액보다도 현저히 높은 점이 문제점(알칼리화)으로 나타났다. 한편 모든 회석액에서 정자의 생리적 삼투압 수준

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

Extenders	Osmol.	pH of extenders (Mean±SD)						
		Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Change
Basic Kp	306.2± 5.4	7.59±0.43	7.77±0.45	7.87±0.43	7.97±0.34	8.00±0.24	8.07±0.22	0.48
BTSg (Ger.)	325.1± 3.2	7.31±0.25	7.44±0.20	7.52±0.28	7.63±0.29	7.66±0.33	7.78±0.32	0.47
Modena	280.2±11.6	6.87±0.06	6.97±0.06	7.06±0.09	7.06±0.06	7.08±0.08	7.15±0.10	0.28
BTSa (USA)	338.2± 1.8	6.81±0.20	7.00±0.20	7.11±0.30	7.22±0.34	7.31±0.38	7.43±0.45	0.62

을 유지하였다.

Basic Kp의 높은 initial pH가 원정액과 희석하였을 때 어떤 변화가 오는지 살펴 본 결과는 Fig. 1과 같다. Basic Kp의 initial pH는 원정액과 희석함으로써 다소 낮아졌지만, 보존기간 중에 pH의 변화는 희석액 단독의 결과(Table 1)와 비슷한 경향을 보였다. 즉, 원정액과 희석한 Basic Kp의 initial pH는 역시 Modena와 BTSa보다 높았다. 그리고 모든 희석정액의 pH는 보존일수가 경과할수록 pH가 점차 증가하였다. 그러나 원정액의 pH는 보존 후 1일째 pH가 증가하였지만 그 이후 급격히 감소하였다.

2. 희석액 Kp의 pH에 대한 EDTA, Tris 및 Citrate의 효과

Basic Kp의 initial pH를 낮추고 보존 중의 pH 변화폭을 줄이기 위하여 3종류의 완충제를 농도별, 단계별로 처리한 결과는 Fig. 2와 같다. 먼저 EDTA를 0, 0.63, 1.25, 2.37g/L 수준으로 첨가한 결과 pH의 변

화는 Fig. 2a와 같다. EDTA 첨가 수준이 높을수록 initial pH는 중성화되었지만, 17°C에서 6일간 보관한 후 pH 변화폭은 EDTA 농도가 높을수록 pH 변화폭이 커졌으며 염기성화가 더욱 촉진되었다(0.32, 0.58, 0.77 vs. 0.68). EDTA의 결정적인 효과는 3일째까지 pH를 안정화 시키는 효과가 있었으나 그 이후에는 pH를 안정화 시키지 못하였다. 실험 2의 두 번째 실험에서는 EDTA의 첨가 수준을 1.25g/L로 정하였는데, 2.37g/L의 수준이 initial pH는 적합(pH7.0)하였지만 삼투압이 이 농도에서부터 증가(302.0~304.5 vs. 321.5)하였기 때문이다.

1.25g/L의 EDTA가 첨가된 Basic Kp에 Tris를 각각 0, 0.18, 0.35, 0.71, 1.42g/L 첨가한 결과 pH의 변화는 Fig. 2b와 같다. Tris의 첨가량과 비례하여 initial pH는 상승했으나 보존경과일에 따른 pH 변화폭은 점점 줄어들었다. 1.42g/L 수준에서는 6일 동안 보관시 pH의 변화는 크게 나타나지 않았으며 (8.49 to 8.42), 이것으로 Tris는 희석액내에서 pH를 안정화 시킨다는 것을 알 수 있었다. 비록 Tris의 첨가로 pH가 안정화 되었지만 initial pH가 8.49(1.42g/L 첨가군)로 높게 나타났으므로 citrate를 이용하여 initial pH를 낮춰 보기로 하였다.

Fig. 2c는 1.25g EDTA와 1.42g Tris가 첨가된 Basic Kp에 Citrate를 0, 0.75, 0.81, 1.00, 1.25, 1.50g/L 수준으로 각각 첨가하여 pH 변화를 살펴보았다. Citrate 역시 EDTA 첨가의 경우와 마찬가지로 첨가량에 따라 initial pH는 낮아졌지만 pH의 변화폭은 점차 증가하였다. 그러나 Citrate의 경우 EDTA보다는 변화폭이 적었으며(0.68~0.77 vs. 0.14~0.51), 1~1.25g/L 첨가 수준에서는 6일간 보존중에 생리적인 pH를 유지할 수 있었다.

이상과 같이 Basic Kp에 1.25g/L EDTA, 1.42g/L Tris, 1.00g/L Citrate를 각각 첨가하여 만든

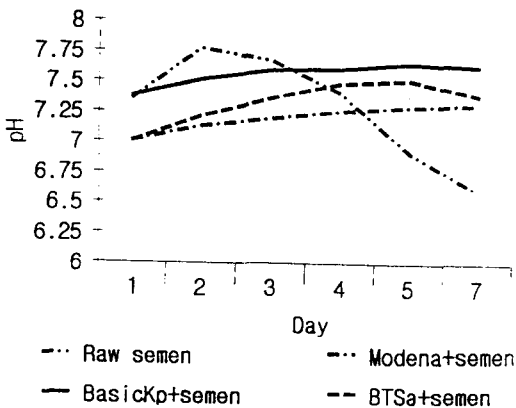


Fig. 1. Serial pH change of boar semen with or without semen extenders at 17°C chamber

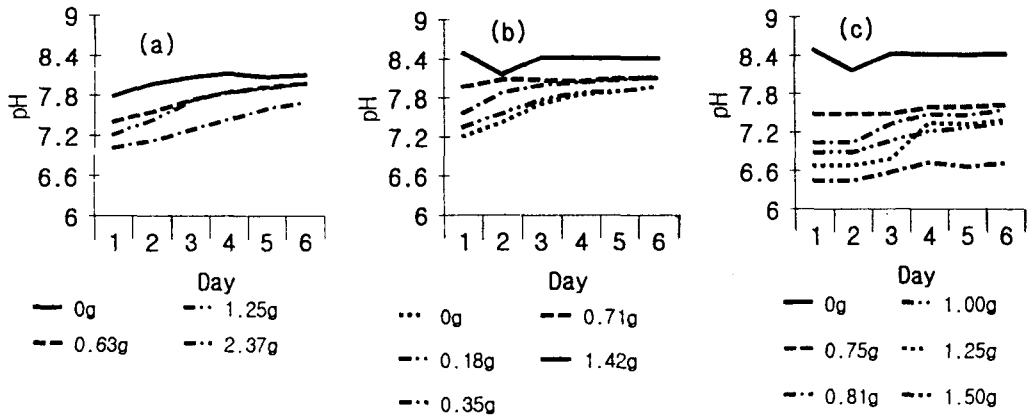


Fig. 2. Effect of EDTA (a), Tris (b) & citrate (c) concentration for the stable and down-regulation of pH in the basic Kp extender

Table 2. Sperm motility of frozen-thawed boar sperm in modified Kp formulated with 1.25g EDTA, 1.42g Tris and 1.00g citrate

Extenders	Initial pH	Sperm survival rate (Mean±SD)					
		Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6
BTSg (Ger.)	7.31	57.3± 7.0 ^b	37.7±15.5 ^b	25.7±14.0 ^b	7.7± 8.6 ^b	4.3± 4.0 ^a	0a
BTSa (USA)	6.87	55.0± 6.2 ^b	46.7± 8.1 ^{a,b}	34.7±10.7 ^{a,b}	14.7± 8.7 ^b	5.3± 4.7 ^a	2.7± 3.1 ^a
Modena	6.81	56.7±24.7 ^b	24.7± 4.5 ^b	15.7± 7.1 ^b	11.7± 5.5 ^b	8.0± 4.0 ^a	3.0± 2.9 ^a
Basic Kp	7.59	71.0± 5.2 ^{a,b}	48.3±16.1 ^{a,b}	37.7±16.3 ^{a,b}	18.7±17.2 ^{a,b}	12.3±11.6 ^a	6.3± 7.1 ^a
Modified Kp	7.03	87.0± 6.2 ^a	70.7±26.7 ^a	62.3±24.4 ^a	34.7± 5.7 ^a	19.0±16.8 ^a	13.3±12.6 ^a

^{a,b}Different superscripts in the same column were significantly different ($p < 0.05$).

새로운 희석액(Modified Kp)은 17℃에서 6일동안 보존할 때 pH를 안정화시킬 수 있었다. 그리고 각 완충제의 첨가량은 Modena와 기타 희석제보다도 EDTA가 약 1/2, Tris가 약 1/4, Citrate가 약 1/3 수준이었으므로 경제적인 측면을 보였다.

3. 정액희석액 종류에 따른 정자의 운동성 변화

Modified Kp와 Basic Kp, BTSg, BTSa 및 Modena로 냉동정자를 희석한 경우 정자 생존율의 변화는 Table 2와 같다. 냉동정자의 생존율은 희석 당일에도 현저한 차이를 보였다. 비록 유의차는 없었으나 Basic Kp는 BTSa, BTSg, Modena보다 생존성이 높은 경향을 보였으며(71.0% vs. 55.0~56.7%), Modified Kp(pH 7.03)가 유의적으로 높은 생존율

(87.0%)을 나타내었다. 그리고 보존경과일에 따른 정자의 생존율은 initial pH가 7.0에 가까운 희석액일수록 높은 생존율을 보였다. 즉, 희석후 3일째 정자의 생존율은 Modified Kp가 다른 희석액에 비해 유의적으로 높았다(62.3% vs. 15.7~37.7%). 그러나 냉동정자는 보존 4일째부터 모든 희석액에서 생존율이 급격히 저하하였다. 그럼에도 불구하고 Modified Kp만은 다른 희석액에 비하여 비교적 높은 생존율(34.7% vs. 7.7~18.7%)을 보였으며, 보존 6일째까지 가장 높은 생존율을 유지하였다.

본 실험의 결과를 종합해 볼 때 희석액 Kp에 1.25g EDTA, 1.42g Tris 및 1.00g/L Citrate buffer를 첨가하여 pH를 안정화시킬 수 있었으며, 그 첨가량은 다른 희석제보다도 1/2~1/4 수준이었으므로 경제

적인 측면에서도 큰 의미가 있다. 아울러 Modified Kp는 BTS나 Modena 등 기존 회석제보다 냉동-융해한 돼지 정자의 액상보존에 효과적인 것을 알 수 있었다.

IV. 고 찰

인공수정 직전까지 정액내 pH를 생리적인 수준으로 유지하는 것은 정자의 수정능력 향상 및 유지에 중요하다. 돼지정자의 생리적인 pH는 6.8~7.5로 알려져 있으며(Bearden과 Fuquay, 1997), 본 실험에 사용된 원정액의 pH는 7.36으로 이 범위내에 있음을 확인하였다.

원정액 단독으로 보관시 pH는 2일째부터 저하되기 시작하였는데, 이는 정자의 에너지 대사과정 중 당의 분해로 생산되는 lactic acid가 hydrogen peroxides와 같은 peroxides로 작용하여 정액내에 축적됨으로써 시간이 경과함에 따라 정액내의 pH는 낮아진다는 보고(Foote, 1984; Bearden과 Fuquay, 1997)와 일치하였다. 그러나 처리하지 않은 원정액을 보관하는 과정 중에 정자의 사멸과 미생물의 오염 또한 pH 저하의 한가지 원인이 될 수 있을 것이다.

냉동되지 않은 원정액을 회석액으로 처리한 경우 시간이 경과함에 따라 pH는 증가하는 경향을 보였는데, 이것은 회석액 처리 후에도 5일째 pH가 급격히 감소한다는 Park 등(1997)의 결과와는 다르게 나타났다. 하지만 이러한 차이는 Park 등(1997)이 사용한 회석액(Bütschwiler, Androhep) 및 첨가된 buffer의 종류(Tris, Hepes)가 본 실험과 달랐기 때문으로 생각된다.

Basic Kp의 높은 initial pH는 EDTA와 citrate 첨가로 낮출 수 있었다. 특히 EDTA의 첨가는 정자의 생존성에도 효과적인 결과를 보여주었는데, EDTA가 pH를 저하시켜 주는 역할뿐 아니라 chelate작용이 있어 정자의 활력을 촉진시켰을 것으로 사료된다. EDTA는 2.37g/L 첨가수준에서부터 회석액내 삼투압이 증가하였는데 본 실험에 첨가된 EDTA가 sodium과 결합된 형태인 때문으로 생각된다. Foote (1969)와 Salisbury 등(1978)은 소정액 보관시 삼투압은 275~325 mOsm 수준에서 높은 수정율을 나타낸다고 보고하였고 Jones과 Foote(1972)은 정자의

운동성에 있어서 300mOsm 이하가 적정 수준이라는 보고한 바 있어, 본 실험에서는 삼투압에 영향을 주지 않고 initial pH가 낮은 1.25g/L 수준을 선택하였다.

Tris는 소와 돼지 정액 회석액의 pH buffer로써 광범위하게 이용되고 있으며, Bearden & Fuquay (1997)는 실온, 5℃, -196℃에서 정자의 생존성을 오래 지속시켜 준다고 보고하였다. Tris의 회석액내 첨가로써 pH 변화는 크게 줄었으나 initial pH의 상승이 나타났다. Tris 첨가로 인한 높은 initial pH는 citrate를 첨가하여 낮출 수 있었으며, 기초실험으로 citrate를 다양한 농도로 첨가하여 initial pH에 따른 정자의 운동성을 조사한 바 원정액의 pH(6.8~7.5)와 일치하는 pH 6.88~7.48 범위내의 정자의 운동성이 그 이하나 이상의 pH에 처리한 경우 보다 높게 나타났다(77~80% vs. 70~75% in day1), Carr 등(1985)은 다섯종의 포유류에서 pH에 따른 정자의 운동성을 검사한 결과 각각의 정액의 pH와 일치하는 buffer에서 가장 좋은 운동성을 나타낸다고 보고하였다.

한편 Tris-Citrate buffer가 첨가된 Modena의 경우 BTS보다 비슷하거나 오히려 낮은 운동성을 나타내었다. 이 결과는 Park 등(1997)이 Bütschwiler에 첨가된 Tris buffer가 온도 변화에 따른 pH변화를 줄여 주므로 9~16℃로 변화하는 온도하에서 Bütschwiler가 Tris가 첨가되지 않은 Androhep보다 시간 경과에 따른 운동성이 우수하다는 보고한 것과는 다르게 나타내었다. 그러나 이러한 차이는 본 실험의 경우 냉동정액을 사용한 것에 기인하는 것으로 생각되며 따라서 냉동정액내의 항동해제와 회석액내의 어떤 성분이 상호 작용을 하여 정자의 생존성에 영향을 미치는지 추후 실험에서 알아볼 필요가 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서는 세 종류의 buffer 즉 EDTA, Tris, Citrate를 Basic Kp에 농도별, 단계별로 pH를 측정 한 결과 정액보존 6일째까지 정자의 생리적인 pH를 유지할 수 있는 최소한의 첨가량을 결정할 수 있었으며, 냉동정자의 회석에 있어서 Modified Kp는 수입, 시판되는 회석제 BTSa, BTSg 및 Modena 보다 유의적으로 높은 정자의 생존결과를 나타내어 경제성과 우수성을 입증하였다. 그러나 Modified Kp를 실용화하기 위해서는 먼저 액상정액의 장기보존에 미치는 영향 및 실제 인공수정 후 자돈생산율을 검증하여야 할

것이며 본 연구소에서는 이에 관한 지속적인 연구를 진행중에 있다.

V. 적 요

본 연구는 독자 개발한 돼지액상정액회석제 Kp (한국생명과학연구소)에 pH를 안정화하여 보존 중 정자의 운동성을 유지시킬 수 있도록 EDTA, Tris, Citrate buffer의 적정 첨가농도를 결정하고자 실시하였다.

Basic Kp와 BTS (Mini-tube, Germany; BT-Sg), BTS (Tri-bio, USA; BTSa), Modena (SGI, USA)를 17℃에서 각각 보관한 경우 모든 회석액에서 시간 경과에 따라 pH가 증가하였고, Basic Kp는 회석 당일의 pH가 다른 회석액에 비해 높게 나타났는데 이것은 돼지액상정액의 생리적인 pH인 6.8~7.5에 비해서도 높은 수준이었다. 정액내의 pH 저하를 방지해 주고 정액의 생리적인 pH를 유지하기 위하여 Basic Kp에 EDTA, Tris, Citrate buffer를 단계적으로 첨가하면서 시간 경과에 따른 pH 변화를 살펴 본 결과 1.25g/L EDTA, 1.42g/L Tris, 1.00g/L Citrate를 첨가한 경우 (Modified Kp) pH는 1일째 6.88에서 6일째 7.33으로 유지되었다. 특히, Modified Kp에 첨가된 buffer의 농도는 Modena와 다른 회석제에 첨가된 농도에 비해 1/2에서 1/4정도로 낮은 수준이었다. Modified Kp와 Basic Kp, BTSg, BTSa 및 Modena로 냉동-융해된 돼지 정자를 회석하여 보존한 경우 정자의 운동성은 Modified Kp가 다른 회석액에 비해 유의하게 높게 나타났다 (87.0% vs. 71.0~48.0% in day 1; 13.3% vs. 6.3~0% of day 6).

이상의 결과를 종합해 볼 때, Modified Kp는 낮은

농도의 EDTA, Tris, Citrate buffer 첨가에도 불구하고 돼지정자의 생리적인 pH 수준을 잘 유지할 수 있었으며, 수입되어 냉동-융해된 돼지 정자에 사용하는 회석제 BTSg, BTSa, Modena 보다도 정자의 운동성에 효과적이었다.

VI. 인용문헌

1. Bearden, H. J. and J. W. Fuquay. 1997. Applied animal reproduction. pp 137-141, 171-186. In Mississippi State Univ. New Jersey.
 2. Carr, D. W., M. C. Uselman and T. S. Acott. 1985. Effects of pH, lactate viscoelastic drag on sperm motility. Biol. Reprod. 33: 588-595.
 3. Foote, R. H. 1984. Buffers and extenders; what do they do? Why are they important? Proc. 10th Tech. Conf. on Artif. Insem. and Reprod. pp 62-70. NAAB.
 4. Jones, R. C. and R. H. Foote. 1972. Nondialyzable skimmilk diluents for ram and bull semen, Dairy Sci. 55:856-861.
 5. Park C. S., M. K. Kim, S. H. Lee, Z. Xu, C. Z. Lee and Y. H. Lee. 1997. Study on the preservation of liquid boar semen at uncontrolled room temperature. Kor. J. Anim. Reprod. 21(1):25-30.
 6. Silisbury, G. W., N. L. VanDemark and J. R. Lodge. 1978. Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle. W. H. Freeman & Co., San Francisco. 2nd ed.
- (접수일자 : 1998. 12. 17. / 채택일자 : 1998. 12. 26.)