

### 황복 (*Takifugu obscurus*) 정액의 물리·화학적 성상과 냉장보존

장영진·임한규·장윤정·김형선\*·허형택\*

부경대학교 양식학과, \*한국해양연구소

## Physico-chemical Properties and Cold Storage of River Puffer (*Takifugu obscurus*) Milt

Young Jin CHANG, Han Kyu LIM, Yun Jeong CHANG, Hyung Sun KIM\* and Hyung Tack HUH\*

Department of Aquaculture, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

\*Korea Ocean Research and Development Institute, Ansan, P. O. Box 29, 425-600, Korea

To obtain the basic data for the preservation of river puffer (*Takifugu obscurus*) sperm, experiments were carried out on the physico-chemical properties and cold storage of milt. The average number of sperm and spermatocrit in milt stripped were  $1.13 \pm 0.34 \times 10^{10} / \text{ml}$  and  $64.8 \pm 1.4$ , respectively. Osmolality of seminal fluid was  $266 \pm 2 \text{ mOsm/kg}$ . Total protein and total lipid from sperm were higher than that from seminal fluid.  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^+$  concentrations were higher in the seminal fluid than in the sperm, while  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{K}^+$  concentrations were lower in the seminal fluid. When sperm of river puffer were preserved in  $0 \pm 0.5^\circ\text{C}$  with various diluents for 16 days, fertilization rate was 0~0.7%. It suggested that cold storage of river puffer sperm was detrimental to sperm fertility.

Key words: river puffer, *Takifugu obscurus*, milt property, cold storage

### 서 론

### 재료 및 방법

황복 (*Takifugu obscurus*)은 연안에 서식하다가 하천 증상류로 소상하여 산란하는 어종으로서, 남획으로 인한 자연자원량의 감소로 인해 자원의 증대가 요구되고 있으며, 새로운 양식대상 품종으로서 중요생산 및 양식 기술의 개발이 필요한 실정이다. 이러한 자원 증대와 양식기술 개발을 위해서는 그 재료가 되는 양질의 알과 정자를 얻는 것이 중요하지만, 황복에서는 인위적인 어미사육이 이루어지지 않고 있는 실정이므로, 이러한 양질의 배우자를 얻는 데는 어려움이 많다. 따라서 이를 해결하기 위한 방법의 하나로서 자연자원의 정자보존이 필요하다.

어류 정자를 산채로 보존하는 방법에는 냉장보존과 냉동보존이 있다 (Stoss, 1983). 이중 정자를 얼리지 않고 냉온상태로 보존하는 방법인 냉장보존은 정자의 단기간 수송, 압수 성숙시기의 차이 극복 및 정자의 운동활성과 생존능력을 연장하는 데에 유용하게 이용될 수 있으며, 냉동보존에 비해 필요한 장비나 경비가 절감된다는 이점이 있다. 정자의 냉장보존에 관한 연구는 연어과 어류의 정자가 0°C에서 며칠동안 생존하였다는 Barrett (1950)의 보고 이후 최근까지 꾸준히 연구가 진행되어 왔다. 그러나, 정자의 냉장보존에 관한 연구는 연어과 어류와 담수어류에 편중되어져 있으며, 보존방법도 종마다 차이를 보이므로 이러한 연구 결과들을 다른 어종에 적용하는 데는 많은 문제점이 따른다. 또한 해수어류의 정자보존에 관한 연구들은 대부분 보존방법의 개선에 국한되어져 있을 뿐, 보존을 위한 적정 희석정액의 개발에 필수적인 조건인 정액의 특성을 파악하여 정자 보존에 이용한 연구는 뱀장어 (Ohta and Izawa, 1996), 무지개송어 (McNiven et al., 1993) 등이 있을 뿐이다.

따라서 이 논문에서는 양식개발 신품종으로 대두되고 있는 황복 정액의 특성을 파악하고, 정자의 냉장보존 조건에 관한 연구를 통해 정자의 보존 기술개발을 위한 기초자료를 제시하고자 한다.

실험어로는 산란기인 5월중에 임진강에서 어획된 황복 어미를 사용하였다 (Table 1).

어체로부터 정액을 채취하기 위하여 실험어를 3-aminobenzoic acid ethyl ester (MS-222) 200 ppm에 마취시킨 후, 비노생식공주위를 눌러 오줌과 배설물을 미리 제거한 다음, 복부를 압박하여 채정하였다. 채취된 정액은 시험관에 넣어 밀봉한 후 실험에 사용할 때까지 보관하였다. 수정에 이용된 알은 충분히 성숙한 어미의 배를 부드럽게 압박하여 배란된 알을 채취하였으며, 이때 피가 섞여 나오지 않은 알만을 선별하여 즉시 사용하였다.

정자의 농도는 2% eosin 용액으로 정자를 염색한 다음, 광학현미경 아래에서 혈구계산판에 의해 계수하였으며, spermatocrit는 일반적인 혈액분석 방법인 microhematocrit법을 변형하여 측정하였다 (Bouck and Jacobson, 1976). 정액을 원심분리 (15,000 rpm, 10분)하여 얻은 정장의 삼투질농도는 삼투압측정기 (The Advanced™ Osmometer)를 사용하여 분석하였다. 정자와 정장의 총 단백질, 총 지질 및 glucose 함량은 각각 biuret반응법, 비색정량법, 효소법으로,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  및  $\text{Mg}^{2+}$  농도는 불꽃분광광도법으로 분석하였다 (由岐, 1984).

희석액의 조성에 따른 정자의 냉장보존 효과를 파악하기 위하여, egg-tris, 0.1 M, 0.3 M, 0.5 M glucose 및 해수어류 생리식염수 (marine fish Ringer's solution, MFRS) 등의 5가지 희석액을 정액과 2:1의 비율로 섞은 후, 희석정액별로 시험관 (φ1.1 cm)에

Table 1. Measurements of the fish used for the experiments

	Total length (cm)	Body weight (g)
Male	30.5~33.5 (31.5)	510~615 (580)
Female	33.0~35.0 (34.2)	710~850 (740)

( ) : average.

분주하였다. 분주가 완료된 회석정액은  $0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 로 유지한 incubator에서 16일간 보존하면서, 1일 간격으로 0.1 ml의 회석정액을 덜어내어 정자활성지수 (sperm activity index, SAI)를 조사하였으며, 보존 16일째에 알과 수정시켜 수정률을 파악하였다. 각 회석액의 조성은 Table 2와 같다.

실험별로 정액의 회석액 처리조건에 따른 운동성을 평가하기 위하여, 전술한 각 실험을 실시한 후의 회석정액을 자연해수와 1:3의 비율로 섞은 다음, 광학현미경으로 관찰된 운동지수에 따라 점수를 부여하였다 (Table 3). 그리고, Table 3의 각 운동점수와 운동정자의 비율에 따라 Strussmann et al. (1994)의 방법을 변형하여 SAI를 계산하였다. 각 실험에 대한 정자활성 지수는 3회 측정하여 평균을 구하였다.

### 결 과

#### 1. 정액의 특성

번식기의 중반에 수컷 어미로부터 채취한 정액과 정액을 원심 분리하여 얻은 정자 및 정장의 특성은 Table 4와 같다. 정액의 ml 당 정자수는  $1.13 \pm 0.34 \times 10^{10}$ 이었고 spermatocrit는  $64.8 \pm 1.4$ 였으며, 정장의 삼투질농도는  $266 \pm 2$  mOsm/kg이었다. 총 단백질 함량과 총 지질 함량은 정장에 비해 정자에서 높은 값을 보였고, glucose는 검출되지 않았다.  $\text{Ca}^{2+}$ 와  $\text{Na}^+$ 는 정자에 비해 정장에서 높은 농도를 보였고,  $\text{Mg}^{2+}$ 와  $\text{K}^+$ 는 정장에 비해 정자에서 높았다.

#### 2. 냉장보존

냉장보존에 적합한 회석액을 결정하기 위하여, 어류 정자의 냉장보존시 많이 이용되는 각 회석액과 채취한 정액을 혼합한 다음  $0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 에서 16일간 보존하면서 SAI를 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. 회석직후의 회석액별 SAI는 egg-tris에서 0.5로 가장 낮

았고, 그의 4가지 회석액에서는 0.9였다. 보존 5일째 0.5 M glucose에서 SAI는 0.65로 다른 회석액에 비해 높은 값을 보였다. 보존 8일째에는 대부분의 회석액에서 SAI가 급격하게 감소하였고, 보존 16일째에는 모든 회석액에서 정자가 운동성을 거의 보이지 않았다. 회석액과 혼합하지 않은 비보존 정액을 알과의 수정에 이용한 대조구에서는 수정률이  $72.4 \pm 3.3\%$ 였으나, 회석액을 egg-tris, 0.1 M, 0.3 M, 0.5 M glucose 및 MFRS로 하여 16일간 냉장보존한 정자를 알과 수정시켰을 때는 0~0.7%로 매우 낮았다 (Fig. 2).

### 고 찰

번식기 중반에 채취한 황복 정액의 ml당 정자수는  $1.13 \pm 0.34 \times 10^{10}$ 으로 무지개송어, *Salmo gairdneri*의  $1.07 \times 10^{10}$  (Piironen and Hyvarinen, 1983)과 비슷한 수준이었고, 질리틸라피어, *Tilapia zilli*의  $7.7 \times 10^8$  (Chao et al., 1987) 보다 많았으며, yellow perch, *Perca flavescens*의  $4.16 \pm 10^{10}$  (Ciereszko and Dabrowski, 1993), 송어, *Mugil cephalus*의  $5.3 \times 10^{10}$  (Chao et al., 1975)보다는 적었다. 황복의 spermatocrit는  $64.8 \pm 1.4$ 로 yellow perch의

Table 4. Milt properties of river puffer

Properties	Sperm	Seminal fluid
Sperm concentration ( $\times 10^{10}/\text{ml}$ )	$1.13 \pm 0.34^*$	—
Spermatocrit	$64.8 \pm 1.4^*$	—
Osmolality (mOsm/kg)	—	$266 \pm 2$
Total protein (g/100 ml)	$1.6 \pm 0.2$	$0.06 \pm 0.05$
Total lipid (mg/100 ml)	$41.8 \pm 24.2$	$36.0 \pm 8.9$
Glucose (mg/100 ml)	ND	ND
$\text{Na}^+$ (mEq/l)	$42.0 \pm 1.2$	$130.7 \pm 8.4$
$\text{K}^+$ (mEq/l)	$44.6 \pm 0.7$	$12.3 \pm 2.0$
$\text{Ca}^{2+}$ (mEq/l)	$0.1 \pm 0.2$	$2.9 \pm 1.7$
$\text{Mg}^{2+}$ (mEq/l)	$10.6 \pm 4.3$	$3.2 \pm 1.3$

\* values in milt. ND : not detectable.

Table 2. Constituents of diluents used in cold storage of river puffer sperm

Diluent	Constituents
Egg-tris	1.424 g citric acid, 20 ml hen's egg yolk, 0.48 g fructose, 400 ppm gentamicin, 2.422 g tris/DW 80 ml
0.1 M glucose	18.1 g glucose/DW 1,000 ml
0.3 M glucose	54.3 g glucose/DW 1,000 ml
0.5 M glucose	90.5 g glucose/DW 1,000 ml
MFRS	0.346 g $\text{CaCl}_2$ , 0.597 g $\text{KCl}$ , 0.017 g $\text{MgCl}_2$ , 13.5 g $\text{NaCl}$ , 0.025 g $\text{NaHCO}_3$ /DW 1,000 ml

DW: distilled water, MFRS: marine fish Ringer's solution.

Table 3. Numerical index for the evaluation of sperm activity index (SAI)

Index	Score	Motility characteristics
I	3	Sperm display forward movement rapidly
II	2	Sperm display forward movement slowly
III	1	Sperm display vibrating movement moderately
IV	0	Immobile sperm

$\text{SAI} = \text{score} \times \% \text{motile sperm} / 100$ .

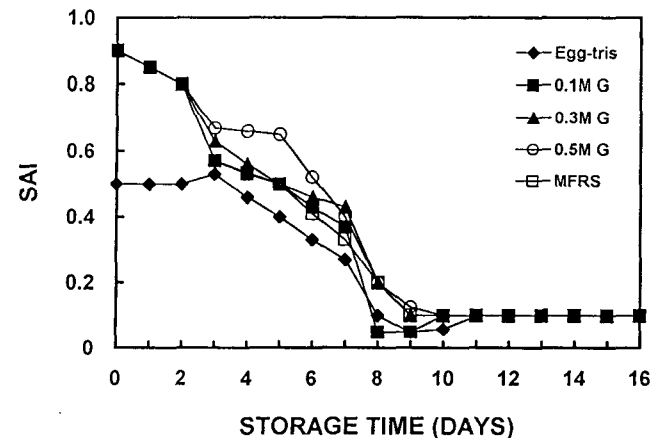


Fig. 1. Variations of sperm activity index (SAI) in sperm stored during 16 days at  $0^\circ\text{C}$  with each 5 diluents in river puffer, *Takifugu obscurus*. G: glucose, MFRS: marine fish Ringer's solution.

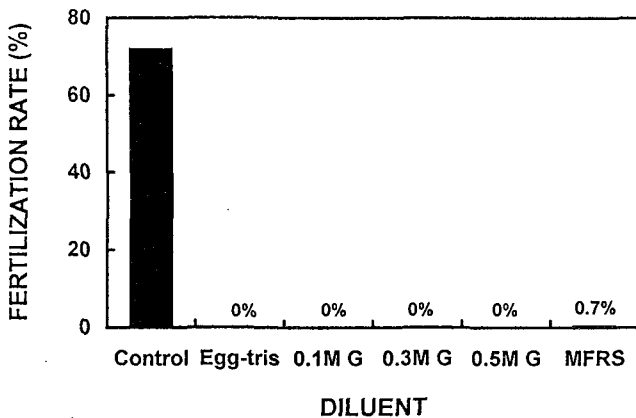


Fig. 2. Sperm fertility after cold storage with each 5 diluents for 16 days at 0°C in river puffer, *Takifugu obscurus*. G: glucose, MFRS: marine fish Ringer's solution.

64.7 (Ciereszko and Dabrowski, 1993)과 비슷하였고, muskellunge, *Esox masquinongy*의 35.7 (Lin et al., 1996), 은연어, *Oncorhynchus kisutch*의 25.6 (Bouck and Jacobson, 1976) 보다는 높았다. 정액의 삼투질농도는  $266 \pm 2$  mOsm/kg으로 담수어류인 muskellunge의 289 mOsm/kg (Lin et al., 1996), perch, *Perca fluviatilis*의 283 mOsm/kg (Lahnsteiner et al., 1995)과 비슷한 수준이었지만, 해수어류인 복숭, *Fugu niphobles*의 342 mOsm/kg (Morisawa, 1985), 감성돔, *Acanthopagrus schlegelii*의 359 mOsm/kg (Morisawa, 1985) 보다는 낮았다. 일반적으로 정액의 삼투질농도는 해수어류가 담수어류에 비해 높은 것으로 알려져 있다. 그러나 황복의 경우에는 하천의 하류부근 및 근해에 서식한다 할지라도 번식기에는 하천의 중상류까지 거슬러 올라가므로, 번식기의 정액 삼투질농도가 환경수의 영향에 의해 담수어류와 비슷해진 것으로 추측된다. 따라서, 앞으로는 서식환경의 차이에 따른 정액 삼투질농도의 변화에 관한 보다 세밀한 연구가 이루어져야 할 것이다. 황복 정액의 총 단백질 함량은  $0.06 \pm 0.05$  g/100 ml로 turbot 정액의 0.88 g/100 ml (Suquet et al., 1993)에 비해 낮았으나, 잉어의 0.13 mg/100 ml (Kruger et al., 1984) 보다는 매우 높았다. 정액 단백질의 역할에 관해서는 구체적으로 밝혀진 바가 없으나, 정액의 삼투질농도를 유지하는 역할을 하는 것으로 추정되고 있다 (Kruger et al., 1984). 지질은 정자 대사의 에너지원인 동시에, 정자가 체외로 방출되었을 때 급격한 온도변화에 의한 충격으로부터 정자를 보호하는 역할을 하는 것 (Kruger et al., 1984)으로 알려져 있는데, 황복 정액내의 총 지질 함량은  $36.0 \pm 8.9$  mg/100 ml로 자바틸라비아, *Oreochromis mossambicus*의 0~0.3 mg/100 ml (Kruger et al., 1984)에 비해 월등히 높았고, 잉어, *Cyprinus carpio*의 9.8~131.6 mg/100 ml (Kruger et al., 1984) 보다는 낮은 수준이었다. 단당류인 glucose와 fructose는 어류 정자의 에너지 공급에 중요한 역할을 하는 것 (Lahnsteiner et al., 1995)으로 밝혀져 있는데, 황복에서는 glucose가 검출되지 않았다. 따라서 황복 정액내의 fructose 존재 가능성과 이와 관련된 에너지 대사에 관한 연구가 필요하다.  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$  및  $Na^+$  등의 이온들은 정자 세포막을 중심으로 막 내외의 농도경사가 포유류의 세포 내외의 이온 농도경사 (강 등, 1997)와 동일한 경향을 보였는데, 이것은 정자의 원

형질막도 생체막과 동일한 선택적 투과성을 가진다는 것을 의미하는 것이다. 또한 이러한 이온들은 정액의 삼투질농도를 유지하는 데도 중요한 역할 (Cruea, 1969)을 하는 것으로 알려져 있다. 정액 특성에 관한 자료들은 정자의 냉장 보존을 위한 희석액 개발에 있어서 희석액의 삼투질농도 및 구성성분의 종류와 농도를 결정하는 데 유용하게 이용될 것이다.

황복 정자를 여러 가지 희석액과 혼합하여 냉장보존하였을 때, 보존 5일째에 0.5 M glucose에서 가장 높은 SAI를 보여 다른 희석액에 비해 보존효과가 높은 것으로 나타났다. Pikey bream, *Acanthopagrus berda*에서는 난황을 포함한 희석액이 정자의 냉장보존에 가장 적합한 것으로 보고 (Palmer, 1994)된 반면, Hara et al. (1982)은 milkfish, *Chanos chanos*의 정자를 0~4°C에서 보존하였을 때, 동종의 혈청이 다른 희석액들 보다 뛰어난 보존효과를 보였다고 하였다. 이처럼 정자의 냉장보존에 적합한 희석액의 종류는 어종에 따라 차이가 있으므로, 각 어종에 적합한 희석액, 특히 삼투질농도나 이온조성이 보존하고자 하는 종의 정액 조성과 비슷한 것을 선택함으로써 냉장보존의 효과를 높일 수 있을 것이다. 황복 정자를  $0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 에서 16일간 보존한 결과, 정자는 운동성을 거의 가지지 않았고, 수정률은 0~0.7%로 매우 낮았다. 이것은 체정시에 혼입된 세균과 부적합한 보존 환경에서 기인한 것으로 생각된다. Saad et al. (1988)은 잉어 정자의 냉장보존시 희석액에 항생제를 첨가하지 않았을 때에는 6~8일만에 수정률이 0%였던 것에 반해, 항생제를 첨가하였을 때에는 16일간 보존한 후에도 80%의 수정률을 보였다고 보고하여, 정자의 냉장보존시 항생제 첨가의 중요성을 강조하였다. 또한 Stoss et al. (1987)은 무지개송어의 정자를 산소가 공급되는 환경하에서 보존액층의 두께를 얇게 하여 보존하였을 때, 운동성이 높았다고 보고하였다. 따라서 황복 정자의 효율적인 냉장보존을 위해서는 항생제 첨가, 산소 공급 및 보존액층 두께 등의 보존조건에 관한 연구가 필요하다.

## 요 약

황복 (*Takifugu obscurus*)의 정자보존을 위한 기초자료를 얻고자, 정액의 특성을 파악하고 정자의 냉장보존 조건에 관한 연구를 수행하였다. 정액의 ml당 정자수는  $1.13 \pm 0.34 \times 10^{10}$ 이었고 spermatozoa는  $64.8 \pm 1.4$ 였으며, 정액의 삼투질농도는  $266 \pm 2$  mOsm/kg이었다. 총 단백질 함량과 총 지질 함량은 정액에 비해 정자에서 높았으며, glucose는 검출되지 않았다.  $Ca^{2+}$ 과  $Na^+$  농도는 정자에 비해 정액에서 높았고,  $Mg^{2+}$ 과  $K^+$ 은 정액에 비해 정자에서 높은 값을 보였다. 황복 정자를 여러 가지 희석액을 이용하여 16일간  $0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 에서 냉장보존 하였을 때, 수정률은 0~0.7%로 보존효과가 저조한 것으로 나타났다.

## 참 고 문 헌

- Barret, I. 1950. Fertility of salmonid eggs and sperm after storage. J. Fish. Res. Bd. Can., 8, 125~133.

- Bouck, G.R. and J. Jacobson. 1976. Estimation of salmonid sperm concentration by microhematocrit technique. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 105, 534~535.
- Chao, N.H., H.P. Chen and I.C. Liao. 1975. Study on cryogenic preservation of grey mullet sperm. *Aquaculture*, 5, 389~406.
- Chao, N.H., W.C. Chao, K.C. Liu and I.C. Liao. 1987. The properties of tilapia sperm and its cryopreservation. *J. Fish Biol.*, 30, 107~118.
- Ciereszko, A. and K. Dabrowski. 1993. Estimation of sperm concentration of rainbow trout, whitefish and yellow perch using a spectrophotometric technique. *Aquaculture*, 109, 367~373.
- Cruca, D.D. 1969. Some chemical and physical characteristics of fish sperm. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 4, 785~788.
- Hara, S., J.T. Canto and J.M.E. Almendras. 1982. A comparative study of various extenders for milkfish, *Chanos chanos* (Forsskal), sperm preservation. *Aquaculture*, 28, 339~346.
- Kruger, J.C. De W., G.L. Smit, J.H.J. Van Vuren and J.T. Ferreira. 1984. Some chemical and physical characteristics of the semen of *Cyprinus carpio* L. and *Oreochromis mossambicus* (Peters). *J. Fish. Biol.*, 24, 263~272.
- Lahnsteiner, F., B. Berger, T. Weismann and R. Patzner. 1995. Fine structure and motility of spermatozoa and composition of the seminal plasma in the perch. *J. Fish Biol.*, 47, 492~508.
- Lin, F., L. Liu and K. Dabrowski. 1996. Characteristics of muskellunge spermatozoa I: ultrastructure of spermatozoa and biochemical composition of semen. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 125, 187~194.
- McNiven M.A., R.K. Gallant and G.F. Richardson. 1993. Fresh storage of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen using a non-aqueous medium. *Aquaculture*, 109, 71~82.
- Morisawa, M. 1985. Initiation mechanism of sperm motility at spawning in teleosts. *Zool. Sci.*, 2, 605~615.
- Ohta, H. and T. Izawa. 1996. Diluent for cool storage of the Japanese eel (*Anguilla japonica*) spermatozoa. *Aquaculture*, 142, 107~118.
- Palmer, P.J. 1994. Chilled storage of pike bream (*Acanthopagrus berda*) sperm and activation in different salinities. *Asian Fish. Sci.*, 7, 35~40.
- Piironen, J. and H. Hyvarinen. 1983. Composition of the milt of some teleost fishes. *J. Fish Biol.*, 22, 351~361.
- Saad, A., R. Billard, M.C. Theron and M.G. Hollebecq. 1988. Short-term preservation of carp (*Cyprinus carpio*) semen. *Aquaculture*, 71, 133~150.
- Stoss, J. 1983. Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. In: D.J. Randall and E.M. Donaldson (Editors), *Fish physiology*, Vol. IX, Academic Press, New York, NY, pp. 305~350.
- Stoss, J., L. Geris and W. Holtz. 1987. The role of sample depth in storing chilled rainbow trout (*Salmo gairdneri*) semen under oxygen. *Aquaculture*, 61, 275~279.
- Strussmann, C.A., P. Renard, H. Ling and F. Takashima. 1994. Motility of pejerrey, *Odontesthes bonariensis* spermatozoa. *Fish. Sci.*, 60, 9~13.
- Suquet, M., G. Dorange, M.H. Omnes, Y. Normant, A. LeRoux and C. Jauvel. 1993. Composition of the seminal fluid and ultrastructure of the spermatozoa of turbot (*Scophthalmus maximus*). *J. Fish Biol.*, 42, 509~516.
- 由岐英剛, 1984. 生化学分析法. 南江堂, 東京, 496 pp.
- 강만식 · 남상렬 · 이양립 · 박영철 · 안태인, 1997. 동물생리학. 교학연구사, 서울, 580 pp.

---

1999년 2월 2일 접수

1999년 4월 15일 수리