

## AndroMed를 이용한 흑우 동결 정액으로 체외수정란 생산 효과

조상래, 최선호, 최창용, 손준규, 김재범, 김성재, 손동수, 김현중\*  
농촌진흥청 국립축산과학원 가축유전자원시험장

### Effect of Production *In Vitro* Embryo with Frozen-thawed Semen using AndroMed Extender in Korean Black Cow Semen

Sang-Rae Cho, Sun-Ho Choi, Chang Yong Choe, Jun-Kyu Son, Jae-Bum Kim, Sung-Jae Kim, Dong-Soo Son and Hyun-Jong Kim\*

Animal Genetic Resources Station, National Institute of Animal Science, RDA, Namwon 590-832, Korea

#### ABSTRACT

The aim of present experiment was to examine commercial synthetic extender(AndroMed) for semen cryopreservation of Korean Black Bull. Semen was collected from a Korean Black Bull using an artificial vagina and transported to the laboratory. The semen was diluted 1:1 by AndroMed. The pellet was diluted to final sperm concentration of  $5 \times 10^5$  /ml by doubling in every 10 minutes at 4°C cold chamber. The semen was equilibrated for 1 hr at cold chamber and packed to 0.5 ml straw. The semen straws were located above 5 cm of liquid nitrogen for 5 minutes, above 5 cm for 10 minutes and above 10 cm for 10 min. And then the frozen straw was plunged to LN<sub>2</sub>. The presented straws were examined the viability and motility after thawed at 37°C water bath. Hanwoo semen was used as KPN (Korea Proven Bull Number) in this experiment. The survival rates was significantly higher in fresh semen than frozen semen (80 ± 14% and 43 ± 11%). However, the motility rates was similar (80.7% and 66.4%). The survival and motility rates were higher in 5cm, 10 min treatment group than the other two groups in straw-located height and duration above LN<sub>2</sub> (50 ± 14% and 70.7% vs, 33.18% and 65 ± 7% vs, 30.14% and 65.7%, respectively). The development rates to cleavage was higher in Black Cow than Hanwoo semen (62.2%, 64.4%), However, The development rates to blastocyst was higher in Hanwoo than Black cow semen (25.9%, 23.0%). In conclusion. The present results that acceptable fertilization and cryopreservation could be obtained by *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen using a synthetic semen extender (AndroMed).

(Key words : bovine, Korean Black Cow, semen, cryopreservation, AndroMed)

#### 서 론

한우의 품종 증 현재 흑우와 칩소는 멸실 위험에 직면한 희소 한우로 분류되어 있다. 최근에는 흑우는 제주도내 34개소에서 310 여두가 사육되고 있다. 흑우는 주로 제주에서 사육되고 있으며, 현재 희소 품종으로 분류되어 있는 흑우는 산업적인 이용은 불가능하나, 국내 가축유전자원의 다양성의 확보 차원에서 소중히 다루어지는 국가적인 중요한 자원이다. 농가에서 흑우의 사육 형태는 한우와 같이 사육하는 형태를 취하고 있다. 이런 희소 한우를 보존하고 이용하는 방안으로서는 정액을 이용한 번식과 그리고 수정란을 이용하여 번식을 유도할 수 있다. 현재는 흑우 정액의 채취와 동결 보존에 대한 연구는 보고되지 않았다. 현재는 국립축산과학원 가축유전자원시험장에서 최초로 희소 한우 정액 동결 보존에 관한 연구

를 수행하고 있다. 인공수정을 위한 정액의 이용 방법으로는 액상 정액의 이용과 동결 정액으로 보존하는 방법이 있는데, 채취한 정액을 -196°C 액체질소에 침지하여 보존하면 반영구적으로 보관이 가능하나(Bolten 등, 2005), 액상 정액 상태로 인공수정에 이용할 수 있는 기간은 축종과 품종에 따라 다양하며, 길어도 1주일 정도는 가능하다는 보고가 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. 그러나 희소 한우 품종으로 분류된

\* Correspondence : E-mail : hyunjongnt@korea.kr

흑우나 최소 정액의 생산과 동결은 각 지방자치 단체 연구 기관에서 일부 생산하여 보관하여 연구 목적으로 제한적으로 이용이 되고 있는 실정이다. 그리고 현재 흑우나 최소의 경우, 멸실 위험 축종으로서 증식을 위한 수단으로서 정액의 생산과 보급이 지속적으로 이루어져야 할 것이다. 노르웨이에서는 특수 가축인 염소의 인공수정을 위해서 지역 민간 인공수정센터를 활성화시켜 액상 정액 상태로 이용하고 있으며(Paulenz 등, 2005), 미국이나 호주 등에서는 우수한 유산양을 선발하여 이들 정액을 채취하여 동결 보존하여 판매 및 인공수정에 활용하고 있다. 우리나라에서도 흑우나 최소 정액의 효율적인 이용을 위해서 액상상태의 정액 이용뿐만 아니라 유전자원의 다양한 보존 측면에서 동결정액의 보존 방법 개발이 필요할 시기라고 할 수 있다.

일반적으로 가축의 정액의 동결 보존액으로 사용되는 것은 난황이나 정액 희석제를 주로 사용한다(Watson 등, 1975). 정액을 보존하는 방법으로는 탈지유, Laiciphos<sup>®</sup>, BTS, Biociphos Plus<sup>®</sup> 희석액과(Paulenz 등, 2005), 정장에 포함된 egg yolk coagulating enzyme(EYCE) 같은 물질도 이용이 된다(Leboeuf 등, 2000), 정장 물질은 정액의 활력을 떨어뜨려 정액을 사출할 때 BSA가 정자막을 코팅함으로써 정자의 활력 유지에 영향을 준다고 보고하였다(Yamashiro 등, 2006). 본 연구에서는 레시틴을 기본 희석제로 하는 AndroMed를 사용하여 흑우 동결 정액의 생산 방법과 용해 후 체외수정란 생산 효율을 조사함으로써 유전자원의 활용과 보존에 이용하고자 본 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 흑우 정액 채취

정액 채취로 사용된 흑우는 3살된 수컷 1두를 선별하여 별도 공간에서 자유 급식하여 사육하였으며, 월 4회 정액을 채취하였다. 정액 채취는 인공질(Model 66000-D, Nasco, FHK, 일본)을 사용하여 채정하였다. 정액 채취를 위해서 암컷을 시험장내 안전 정액 채취실 보정틀에 고정시킨 후, 흑우 수컷을 2~3회 암컷을 주위를 맴돌게 하여 흥분을 유도하였다. 승가가 이루어지면 수컷의 penis를 인공질에 삽입하여 정액 채취를 하였다. 인공질의 유지온도는 38℃를 유지하였으며, 인공질에는 penis의 삽입을 부드럽게 하기 위하여 젤리를 발랐다. 사출된 정액은 인공질 끝부분에 15 ml 튜브를 채취전에 위치시켜 정액을 회수하였다. 회수된 정액은 37℃ 온장고에 넣어 신속하게 실험실로 이동하였다. 한우에 사용된 정액은 KPN 동결정액을 사용하였다.

### 2. 정액 처리 및 제조

사출 정액은 채취 즉시 37℃ 이동식 온장고에 넣어 10분

이내에 실험실로 운반하였다. 실험실의 클린벤치 내에서 원정액과 AndroMed(Minitüb, Tiefenbach, Germany)를 1:1의 비율로 희석한 다음 2차 희석은 콜드 챔버 내에서 10분간 평형 후 7차까지 동일한 방법으로 평형을 유도한다. 마지막 7차 희석 후 0.5 ml 스트로에 충전하기 전까지는 1시간 동안 평형을 실시한 다음, 0.5 ml 스트로에 최종  $5 \times 10^5$  /ml 농도가 되게 하여 스트로내에 충전한 다음 1시간 동안 콜드챔버내에서 평형을 실시한 후, 김 등(2006)의 정액 동결 방법을 일부 수정하여 실시하였다. 정액 동결은 3가지 방법으로 나누어 실시하였다. 액체질소 상단 5 cm, 5분, 5 cm 10분, 10 cm, 10분간 동안 정액 동결을 실시한 후 액체 질소에 침지하였다. 정액의 용해는 공기 중에 약 10초간 용해한 후 37℃ 온수에서 20초간 스트로우를 침지하여 용해하였다.

### 3. 정자 생존성 및 운동성 평가

정액의 활력과 생존성의 평가는 MicroLux 현미경( $\times 70$ , Olym-pus, Japan)하에서 정자의 활력을 평가하였으며, 정자의 용해 정액을 Marker Chamber에 넣은 후 정자를 평가하였다. 혈구 계산판에 5  $\mu$ l의 정액을 놓고 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 반복적으로 관찰하여 생존 정자 비율을 퍼센트로 나타내었다. 관찰되는 거의 모든 정자들이 소용돌이 치며 활발하게 움직이는 것을 90% 이상으로, 생존 정자들이 격자별로 100개가량을 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. 동결 정액의 발생능 확인을 위해서 일반적인 체외수정란 생산은 조 등(2008)의 방법에 준하여 실시하였다.

### 4. 한우 난포란의 체외성숙

한우 도축 암소로부터 적출된 난소를 회수하여 실험실로 운반하여 실험에 공시하였다. 본 실험의 조건에 맞춘 난소 수송 온도는 0.9% 생리식염수의 온도를 25℃ 이상의 조건으로 맞추어 보온병에 담아 실험실로 2시간 이내로 운반하였다. 직경이 2~6 mm의 난포로부터 난포란을 난포액과 함께 19 gauge 주사침이 부착된 10 ml 주사기를 이용하여 흡입 방법으로 난모세포를 채취하였으며, 체외성숙을 위한 난모세포는 1.2 등급(IETS 기준)만을 사용하였다. 체외성숙은 TCM199(Sigma, U.S.A)를 기본배양액으로 5% FBS(Gibco, U.S.A), 10  $\mu$ g/ml LH(Sigma, U.S.A) 및 35  $\mu$ g/ml FSH(Sigma, U.S.A)를 첨가하여 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터 내에서 22시간 동안 실시하였다.

### 5. 체외수정

체외수정에 사용된 정액은 가축유전자원시험장에서 생산된 흑우 동결 정액을 이용하였으며, 정자 분리는 BO 배양액을 이용하였으며 1,800 rpm에서 5분 동안 2회 원심분리 후 체외수정용 배양액에서 1회 원심 분리하여 체외수정에 사용하였다. 사용된 정액의 최종 농도는  $2 \times 10^6$ /ml이었다. 체외성숙된 난포란의 난구세포 일부를 제거하기 위해서 0.1% PVA (polyvinyl alcohol)가 첨가된 D-PBS (Sigma) 배양액에서 약 10초간 vortexing 후 수정 배양액인 IVF 100(IFP, Japan) 50  $\mu$ l 미소적에 약 15개의 체외성숙된 난포란과 정자를 약 6시간 동안 공동 배양하여 체외수정을 유도하였다.

### 6. 수정란의 체외배양

체외수정 후 체외 배양을 위해서 무혈청 배양액인 IVD(IFP, Japan) 배양액에 5% FBS를 첨가하여 체외배양을 실시하였다. 체외배양은 5% CO<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub> Incubator에서 체외발달을 유도하였으며, 배양 dish는 6-well(IFP, Japan) 50  $\mu$ l 배양액에 15개의 수정란을 넣어 배양을 실시하였다. 수정란의 발달을 조사는 체외수정 후 48 시간에 도립현미경(IX 70, Olympus)하에서 분할율을 조사하였으며, 72(3일)시간과 120(5일)시간에 신선한 배양액 약 25  $\mu$ l를 각 well에 첨가하였으며, 배반포기까지의 발달을 조사는 수정 후 7일과 8일째 실시하였다.

### 7. 통계 분석

실험 결과의 통계학적 분석은 SAS package(version 6.12)이 용과 GLM producer를 사용하여 각 처리구간 유의성을 검증하였다.

## 결과 및 고찰

Table 1은 흑우로부터 채취한 정액과 동결 보존 후 융해한 정액의 생존성과 활력을 비교한 결과이다. 본 실험에서는 흑우로부터 정액 채취를 5회 반복적으로 실시하였다. 채취한 정액은 실험실로 운반한 다음 정액의 평가를 실시한 결과로서 신선정액의 생존율과 활력은 80% 수준으로서 정액이 우수한 것으로 평가되었으나, 정액을 동결 융해한 후의 생존성과 활력 조사에서는 43%와 66%의 결과를 나타내었다. 최근에 Fukui 등(2008)은 AndroMed를 희석제로 사용하여 숫양의 정액을 동결 보존 후 인공수정을 실시하였을 때 57%의 산자 생산율을 보고하였는데, 이것은 일반적으로 난황이 첨가된 희석제를 이용한 것과 비교하였을 때 65%의 결과와 유사하게 나타났다고 보고하였다. 흑우 동결정액은 한우 정액과 비교하였을 때는 생존성과 활력이 떨어지는 경향을 보였다. 이러한 결과는 흑염소에서는 비슷한 결과를 나타내었다. 흑염소 정액을 AndroMed를 이용하여 최종 희석 후 활력은 85%였으며, BTS 희석

Table 1. Effect of survival and motility of before and after semen freezing in collected Korean bull semen

Semen	Evaluation to semen (%)	
	Survival	Motility
Fresh	80 $\pm$ 14 <sup>a</sup>	80 $\pm$ 7
Frozen	43 $\pm$ 11 <sup>b</sup>	66 $\pm$ 4

<sup>ab</sup> Percentage with different superscripts within columns indicate significant different ( $p < 0.05$ ).

Replicates 6.

액을 이용한 처리구에서 4°C 냉장고에서 보관하였을 때 운동성이 완전히 소멸된 것으로 나타났다(김 등, 2006). 이러한 결과는 정액의 저온 충격에 따른 운동성의 저하로 생각되는데, 실제 BTS에는 세포막을 보호하여 저온 충격을 완충시켜 줄 수 있는 지질 성분이 포함되어 있지 않은 것으로 사료된다. 소의 정액을 채취할 때 Triladyl<sup>®</sup>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. 이와 유사하게 Yamashiro 등(2006)은 염소 정액 채취시 농도의 BSA가 함유된 튜브내로 정액을 채취하여 동결 후 융해하였을 때 정자의 acrosome 상태가 완전하게 유지되고 활력이 77%로 크게 증가되었다고 보고하였다. 이러한 결과는 본 연구의 5 cm, 5분간 동결한 조건의 활력과 유사한 결과를 나타내었다. 그러나, Modena 희석제를 사용하였을 때 4°C에서 BTS보다는 나았지만 빠르게 운동성이 감소하였다고 보고하였다(De Pauw 등, 2003). 현재 BTS와 Modena 희석제는 돼지 액상 정액의 보존에 가장 많이 사용되고 있으며, 구성 성분은 glucose, sodium citrate, sodium bicarbonate, EDTA, potassium chloride 등을 함유하고 있다. 돼지 정액은 저온 충격에 매우 약한 경향을 나타낸다. 따라서 흑우 정액이 한우와 비교하였을 때 저온 충격에 상대적으로 낮아 생존율이나 활력이 저하될 것으로 사료되어 흑우 정액동결 보존에 BTS와 Modena 희석제 사용이 가능할 것으로 보인다. Paulenz 등(2002)은 정액을 우유에 난황을 첨가한 희석액, sodium citrate에 난황을 첨가한 희석액, Tris, fructose, citric acid에 난황을 첨가하였을 때 정자의 활력이 다른 희석액들보다 좋은 것으로 보고하였고, Hollinshead 등(2003)은 유세포 분리기를 이용하여 암수 정자를 분리한 후 5°C로 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. 정장에는 난황을 응결시키는 효소가 있어 정액의 동결 보존을 위해서는 반드시 정장을 제거

하여야 염소의 경우는 난황이 응결되어 정자 생존성의 저하를 막을 수 있다고 알려져 있다(Roca 등, 1997) 숫양의 정액을 액상 보존한 연구들에서는 정장을 제거하지 않고 사용하고 있으며, 흑우에 있어서도 Andromed를 이용하여 정액 동결 보존을 실시한 결과 생존율은 기존의 70% 내외로 다소 낮아 지지만 활력은 차이를 보이지 않아, 봉입 정자수를 높인다면 생물제제를 사용하지 않고 장기간 유전자원으로 보존이 가능함을 확인하였다. Anel 등(2006)은 콩의 레시틴 성분이 함유된 AndroMed는 난황과 같은 높은 phospholipid를 함유하고 있어 인공수정에 안전하게 이용할 수 있다고 보고하였다. 현재의 동결 실험 조건으로 생산된 동결 정액을 이용하여 흑우의 산자를 생산하였다. 그러나 동결정액의 생존성이나 활력을 높일 수 있도록 더 많은 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

Table 2에서는 흑우 정액의 동결 방법에 따른 생존율과 활력을 조사하였다. 처리구는 3가지 방법으로 나누어 실시하였다. 정액을 4°C 쿨링 챔버내에서 스트로우에 봉입한 후 정액 동결 전용 스티로폼 박스내에 액체질소를 넣은 다음 액체질소 표면에서부터 상단 5cm에서 10분간 그리고 5cm, 10분간, 10cm 10분간 처리 후 액체질소 속으로 침지하여 동결을 실시하였다. 정액을 동결할 때 일반적인 사실은 동결에 앞서 동결 보호제에 노출시키는 시간은 용해 후의 정액의 특성에 영향을 준다. 그리고 정액을 동결시 액체질소를 이용한 동결 방법에 따라서도 생존성은 차이가 발생하며, 액체질소의 상단 끝에서 정액 스트로를 올려놓는 높이와 시간에 따라서 생존성과 용해 후 활력의 차이를 보인다. 일반적으로 소의 정액 동결 보존을 위해서 사용하는 동결 보존액으로는 Triladyl™과 Andromed® 상업적으로 판매되는 합성 동결 보존액으로 소의 동결 보존을 위해 개발되었으며, 최근에는 양(Kasimanickam 등, 2006; Perez-Garnelo 등, 2005), 가젤(Garde 등, 2003), 유럽 들소(Perez-Garnelo 등, 2006), 사슴(Esteso 등, 2003) 등 다른 축종이나 멸종 동물의 정액 동결 보존에 활발히 활용되고 있다. 상업적으로 판매되는 제품의 특성상 희석제의 조성은 정확하게 알려져 있지 않으나, 동해 방지를 위해 비침투성 동해 방

지제로 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). De Pauw 등(2003)은 소의 정액을 Triladyl® 희석액에 20% 난황과 6.7%의 글리세롤을 첨가하여 6일간 상온과 4°C에서 보존하였을 때 정자 운동성이 그대로 유지된 반면 HEPES-TALP에서는 급격하게 운동성이 저하되었다는 결과를 보고하기도 하였다. 이러한 원인은 종간의 특이적인 생리적 현상과 변이 때문인 것으로 추정할 수 있을 것으로 보인다.

Table 3은 한우 난포란을 이용하여 한우와 흑우 정액을 이용하여 체외수정 후 후기배로까지의 발달율을 조사하였다. 수정 후 난포란의 배양액 교환은 수정 후 72시간째와 120시간째 신선한 배양액으로 교환하여 체외 발달을 유도하였다. 한우에 있어서는 체외수정 후 48시간째 분할율은 62.6%였으나 흑우는 64.6%로서 한우보다 다소 높은 경향을 보였으며, 수정 후 192시간째 배반포기배의 발달율은 한우 정액을 이용하였을 때 25.9%, 흑우 정액은 23%의 배발달율을 나타내었다. 수정 후 분할율에서 한우보다 다소 높은 발달율을 보인 것은 정자의 수정능과 관련한 여러 가지 요인들이 있지만 현재의 흑우의 정액 동결 보존 방법에는 효과적인 것으로 사료된다. 정액의 희석제에 스테로이드 호르몬과 그 전구 물질이 함유된 난황이 포함되면 위생적 위험이 생기게 된다(Hartman 등, 1998). 또한 표준화된 희석제의 질이 떨어질 때 난황을 첨가하기도 한다(Müller-Schlösser 2001). 희석제의 잘못된 선택은 인공수정이나 수정란 이식을 위해 사용하였을 때 수태율과 수정란 생산성 저하를 가져오는 원인이 되기도 한다. 현재의 Andromed를 동결 보호제로 사용하였을 때 체외 수정란 생산과 인공수정과 같은 다양한 이용 목적에 따라서 사용이 가능할 것으로 사료된다. 안정적인 수정란 생산은 이식을 통한 가축의 증식과 개량을 위해서 중요하다. 질적으로 우수한 수정란 생산은 배양체계의 개선으로 체내·외 수정란의 동결 후의 생존성 향상을 위해서 배양 조건은 매우 중요하다. 상업적으로 활용을 위해서는 수정란의 질적 향상을 위해 난관 상피세포와 함께 배양 조건을 갖추기도 한다(Camous 등, 1984). 수정란의

Table 2. Effect of straw-located height and duration above LN<sub>2</sub> at freezing on viability and motility of frozen-thawed Korean Black bull semen

Treatments	Post-thawed(%)	
	Survival	Motility
5cm, 5min	50 ± 14	70 ± 7
5cm, 10min	33 ± 18	65 ± 7
10cm, 10min	30 ± 14	65 ± 7

Replicates 5.

Table 3. Development competence of *in vitro* bovine embryos by using different frozen-semen

Source	Used oocytes	To developmental competence (%)	
		Cleavage	Blastocysts
Hanwoo	347	216 (62.2)	56 (25.9)
Black	378	244 (64.6)	56 (23.0)

Replicates 7.

질적 향상을 위해서 아미노산과 비타민을 첨가함으로써 수정란의 분할율과 배발달율을 향상시켰다고 보고하였다(Rosenkrans와 Frist, 1994). 이와 마찬가지로 본 연구에서도 혈청이 첨가되지 않은 단순배양액을 이용하여 수정란의 체외배양을 실시한 결과 두 처리군간의 차이는 나타나지 않았다. 흑우정액의 동결 방법에 따른 생존성과 활력 그리고 체외수정란 생산 결과로 미루어 볼 때 인공수정과 수정란이식 그리고 회소가축의 생식세포 동결 보존을 위해서 적당한 방법이라고 사료된다.

## 결 론

회소 한우로 분류된 흑우 동결 정액 생산과 동결 방법 확립을 통하여 흑우 정액의 동결 보존과 이용성 증대 및 유전자원으로서의 복원력을 증대시키기 위하여 본 연구를 실시하였다. 흑우로부터 채취한 신선 정액의 생존성은 80±14%, 활력은 80±7%의 결과를 보였으나, 신선정액을 동결 보존 후 용해하였을 때 정액의 생존율은 43±11%, 활력은 66±4%의 결과를 보였다. 신선정액과 동결 정액의 생존율에서는 신선정액의 유의적으로 높은 결과를 보였으나, 정액의 활력에 있어서는 두 처리군간의 비슷한 결과를 보여 동결 정액을 체외수정을 위해서 사용이 가능할 것으로 사료된다. 정액의 동결 방법에 따른 수정란의 생존율과 활력은 액체질소 상단으로부터 5 cm, 5분간 처리하였을 때 생존성은 50±14%, 활력은 70±7%, 질소 상단 5 cm, 10분간 실시하였을 때 생존성은 33±18%, 활력은 65±7% 그리고 질소 상단 10 cm, 10분간 처리하였을 때 생존율은 30±14, 활력은 65±7%의 결과를 보였다. 체외수정란 생산 실험 결과는 한우와 흑우 정액의 수정율은 62.6%와 64.6%, 그리고 배반포기배까지의 발달율은 25.9%와 23%의 결과를 보여 흑우 동결 정액의 수정율과 배발달율은 한우와 비슷한 결과를 나타내었다. 따라서 본 연구에서 AndroMed 희석제를 이용한 흑우 정액의 동결방법의 활용으로 인공수정과 수정란이식과 그리고 회소가축의 생식세포 보존을 위한 중요한 자료가 될 것이며, 생존율과 운동성 증대를 위해서 다양한 희석제를 활용한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 참고문헌

- Anel L, Alvarez M, Martinez-Pastor F, Garcia-Macias V, Anel E and de Paz P. 2006. Improvement strategies in ovine artificial insemination. *Reprod. Dom. Anim.* 41:30-42.
- Bolten M, Weissbach L and Kaden R. 2005. Cryopreserved human sperm deposits: usability after decades of storage. *Urologe A.* 44:904-908.
- Camous S, Heyman Y, Meziou W and Menezo Y. 1984. Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicle. *J. Reprod. Fert.* 72:479-485.
- De Pauw IMC, Van Soom A, Maes D, Verberckmoes S and de Kruif 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.
- Fukui Y, Kohno H, Togari T, Hiwasa M and Okabe K. 2008. Fertility after insemination using a synthetic semen extender in sheep. *J Reprod. Dev.* 54:286-289.
- 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 mhorh* and *G. dorcas neglecta*). *Biol. Reprod.* 69:602-611.
- Hartmann S, Lacorn M and Steinhardt H. 1998. Natural occurrence of steroid hormones in food. *Food Chem.* 62:7-20.
- 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°C. *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.* 18;62(1-3):113-41.
- Müller-Schlösser F, Aires V, Hinsch E and Hinsch K-D. 2001. Evaluation of the quality of a new generation of egg yolk-free semen diluters for cryopreservation of bovine semen. 34. Jahrestagung über Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung. Giessen : 54.
- 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 Soderquist 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.
- Rosenkrans CF Jr and First NL. 1994. Effect of free amino acid and vitamin on cleavage and development rate of bovine zygotes *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 72:434-437.
- 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.
- Waston PF and Martin IC. 1975. The influence of some fractions of egg yolk on the survival of ram spermatozoa at 5 degrees C. *Aust. J. Biol. Sci.* 238:145-152.
- 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.
- 김현중, 최창용, 최선희, 손동수, 최순호, 상병돈, 한만희, 류일선, 김인철, 김일화, 임경순, 김성재, 조상래. 2006. 희석액의 종류가 재래 흑염소 액상 정액의 생존율에 미치는 영향. *한국수정란이식학회지* 21(4):339-344.
- 조상래, 최창용, 김현중, 최선희, 손동수. 2008. 한우 수정란의 동결 보존 후 발달 효율 비교. *한국수정란이식학회지* 23(3):223-227.

---

(접수일: 2009. 8. 29 / 채택일: 2009. 9. 10)