

## 제주 흑우 동결 정액 제조에 있어 Glycerol의 농도에 따른 생존율 및 정자 침체 양상의 변화

최선희, 고민희, 강태영, 조상래, 박용상, 오신애\*  
국립축산과학원 난지축산시험장

### Change of Sperm Viability and Acrosome Integrity of Post-thawed Korean Jeju Black Bull Spermatozoa according to Glycerol Concentration

Sun-Ho Choi, Min-Hee Ko, Tae-Young Kang, Sang-Rae Cho, Yong-Sang Park and Shin-Ae Oh\*  
Subtropical Animal Experiment Station, National Institute of Animal Science, RDA, Jeju 690-150, Korea

#### ABSTRACT

This study was carried out to establish most suitable freezing condition, to evaluate the different glycerol concentration of freezing and thawing rates on motility, viability, membrane integrity and acrosome integrity of frozen Korean Jeju Black Bull spermatozoa. Semen was collected from a Korean Jeju Black Bull using an artificial vagina and transported to the laboratory. The semen was extended gradually 1:5 then cooled slowly for 2 hrs to 4°C. The semen was diluted 1:1 with cryoprotectant extenders (3%, 5% and 7% glycerol) and equilibrated for 2 hrs at cold chamber and packed to 0.5 ml straws. The semen straws were located above 3 cm of liquid nitrogen for 5 minutes, above 5 cm for 10 min and above 8 cm for 10 min. And then the frozen straw was plunged into LN<sub>2</sub>. The presented straws were examined the viability and motility after thawed at 37°C water bath. The viability and membrane integrity immediately post-thawing were significantly higher in samples frozen in 7% glycerol than 3% and 5% glycerol ( $p<0.05$ ). After CTC staining to assess acrosome integrity, F pattern was significantly increased, but B pattern was significantly decreased in 7% glycerol ( $p<0.05$ ). Freezing distance of 5 cm from liquid nitrogen and pre-cooling for 10 min yield better survival and membrane integrity, but not significant difference. However, AR pattern according to CTC staining was significantly decreased in 3 cm for 5 min.

(Key words : Korean Jeju Black Bull, semen freezing, cryoprotectants, glycerol)

#### 서론

제주 흑우는 FAO에 등록되어 있는 한우 중 최소 등과 함께 멸실 위험에 처한 희소 한우로 분류되고 있다. 최근 흑우는 제주도내 34개소에서 310여두가 사육되고 있으나 (2010), 희소 품종으로 분류되어 있어 산업적으로 이용성이 낮다. 그러나 국내 가축유전 자원의 다양성 확보 및 국가 중요 유전 자원으로서 안정적인 보존이 필요하다. 이러한 희소 한우인 제주 흑우를 보존하고 이용하는 방안으로서는 정액을 이용한 번식과 수정란을 이용한 번식으로 증식이 가능하다. 정액을 이용한 보존은 수정란을 이용한 보존에 비하여 취급이 용이하고, 안정적이므로 수정란에 비해 손쉽게 보존이 가능하다. 그러나 현재 제주 흑우의 정액의 채취와 동결 보존에 관련된 연구가 매우 미흡한 실정이다. 따라서 현재 멸실 위험 축종인 제주 흑우의 증식을 위한 수단으로, 정액의 생산과 보급이 지

속적으로 이루어져야 할 것이다. 인공수정은 소뿐만 아니라 다른 가축에 있어 유전적인 개선과 유전 자원의 확보에 크게 공헌하고 있다. 즉, 인공수정은 유전자의 급속한 보급과 가축 유전자 품질을 향상시키기 위한 가장 주요한 방법이다(Vishwanath와 Shannon, 2000). 인공수정을 위한 정액의 이용 방법에는 액상 정액의 이용과 동결 정액으로 보존하는 방법이 있는데, 채취한 정액을 동결하여 -196°C에서 보존하면 반영구적으로 보관이 가능하다(Bolten 등, 2005). 그러나 정자를 포함하여 많은 세포들은 동결 후 생존율은 액체질소에 침지하기 전의 냉각 온도와 동결 속도 그리고 동결 방법에 따라서 생존율과 활력에 영향을 미친다(Leibo와 Bradly, 1999). 정자는 다양한 동결 조건에 따라 약 50% 정도의 세포 손상을 입게 된다(Watson, 2000). 이러한 세포 손상은 동결 과정 동안에 세포질내의 빙상 결정화에 의해 기인하는 것으로(Mazur, 1984), 이러한 손상을 방지하기 위한 희석제의 조성 및 동결 보호제

\* 본 연구는 2011년도 농촌진흥청 국립축산과학원 박사후연수과정지원사업에 의해 이루어진 것임.

\* Correspondence : E-mail : spokis@naver.com

는 성공적인 동결 정액 제조에 있어 가장 중요한 요인이라고 할 수 있다(Hammerstedt 등, 1990; Curry 등, 1994). 동결 방법에 있어 다양한 희석제가 사용되고 있는데, 소에서 주로 사용되는 정액 희석제로는 Tris-Egg yolk extender 또는 milk extender 가 널리 사용되고 있다(Ahmad 등 1984; Ahmad 등, 1986; Biolodeau 등, 2002). Polge 등(1949)이 고안한 이후, 대부분의 동결 정액 제조 시 사용되는 방법으로 glycerol이 동결 보호제로 사용되고 있으며, methanol, ethylene glycol 등과 함께 동결 정액 제조에 이용되는 대표적인 세포막 침투성 동결 보호제로 알려져 있다. Glycerol은 동결 시 세포내 빙정화를 방지하기 위해 세포내 물을 탈수하도록 하며, 자신이 세포질 내 침투하여 물 대신 세포를 유지함으로써 동결 침해를 방지한다. 그러나 glycerol은 상온에서 세포내에 독성을 나타내므로 저온에서 평형을 유지해야 하는 단점을 가지고 있으나, 보편적으로 glycerol보다 간편하게 이용되는 물질은 아직 명확하지 않다. 이에 본 연구에서는 소 동결 정액 제조 시 가장 보편적으로 사용되고 있는 Tris-Egg yolk extender와 침투성 동결 보호제인 glycerol을 제주 흑우의 동결 정액을 생산을 수행하여 glycerol과 동결 속도가 제주 흑우 정자의 생존을 및 침체 양상에 미치는 영향을 조사하고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 제주 흑우 정액 채취

정액 채취로 사용된 흑우는 3세 이상의 수컷 4두를 선발하여 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 안전 정액 채취실 보정틀에 고정시킨 후, 제주 흑우 수컷을 2~3회 암컷의 주위를 맴돌게 하여 흥분을 유도하였다. 승가가 이루어지면 수컷의 penis를 인공질에 삽입하여 정액 채취를 하였다. 인공질의 유지온도는 38℃를 유지하였으며, 인공질에는 penis의 삽입을 원활하게 하기 위하여 젤을 도포하였다. 사출된 정액은 인공질 끝부분에 15 ml tube를 채취 전에 장착하여 정액을 회수하였다. 회수된 정액은 37℃ 온장고에 넣어 신속하게 실험실로 이동하였다.

### 2. 정액 처리 및 제조

본 실험에 이용된 보존액의 조성은 Table 1과 같으며, 동결 보호제로 3, 5, 7%의 glycerol을 사용하였다. 채취된 정액은 즉시 실험실로 운반하고, 실험실의 클린 벤치 내에서 원정액을 Tris-egg yolk extender를 이용하여 5 단계를 거쳐 점차적으로 희석하며 총 2시간 동안 냉장시켰다. 마지막 희석 후, glycerol(3, 5, 7%)이 첨가된 희석액을 첨가하여 2시간 동안 평형을 유도하였으며, 평형이 된 정자는  $5 \times 10^6$  /ml로 조정된 후에 0.5 ml

Table 1. Composition of Tris-egg yolk extender

Component	Concentration
Tris	121.1 mM
Fructose	180.2 mM
Citric acid	294.1 mM
Egg yolk	10%
Gentamycin	3, 5, 7%
Streptomycin sulfate	10 mg/ml
Glycerol	0.3g/l

의 straw에 충전 봉합하였다. 동결 속도가 정자에 미치는 영향을 관찰하고자 7%의 glycerol을 첨가한 희석액을 사용하여 액체질소의 표면에서 각각 3 cm 높이에서 5분, 5 cm 높이에서 10분, 8 cm 높이에서 10분간 노출시켜 예비 동결을 실시한 후에 액체질소에 침지하여 동결을 완료하였다. 동결된 정액은 일정시간 동안 LN<sub>2</sub> tank에서 보관한 후에 필요시 용해하여 사용하였다. 동결 정액의 용해는 공기 중에서 약 10초간 용해한 후 37℃ 온수에서 20초간 침지시켜 용해한 후 정자의 생존을 및 침체 양상을 조사하였다.

### 3. 정자의 활력 평가

정액의 활력과 평가는 MicroLux 현미경( $\times 70$ , Olympus, Japan)하에서 정자의 활력을 평가하였으며, 혈구 계산판에 5  $\mu$ l의 정액을 넣고 커버 글라스를 덮은 후 100배율에서 정자의 운동성을 평가하였다. 혈구 계산판의 격자 2군데를 반복적으로 관찰하여, 관찰되는 거의 모든 정자들이 소용돌이 치며 활발하게 움직이는 것을 90% 이상으로, 생존 정자들이 격자 별로 100개 가량을 관찰하여 활발하게 움직이는 정자들이 80% 이상일 때 80%, 70% 이상일 때 70%로 판단하고, 움직이는 정도가 전진 운동 또는 느리게 전진 운동하는 수준일 때 50%, 느리게 전진 운동하거나 진자 운동 혹은 미동하는 수준일 때 20%로 평가하였다.

### 4. 정자의 생존을 평가

정자의 생존성은 Eosin Y 염색법을 이용하여 생존율을 평가하였다. 0.9% NaCl 용액에 0.5% Eosin Y를 용해한 후 10  $\mu$ l의 정액을 슬라이드글라스 위에 올린 다음 동량의 염색액을 섞어 도말한 다음 커버 글라스를 덮고 MicroLux 현미경( $\times 70$ , Olympus, Japan)하에서 관찰하였다. 100배율에서 염색 상태를 관찰하여 표본 1개당 200개의 정자를 카운트하여 붉게 염색된 죽은 정자의 비율을 계산하였으며, 개체 당 2개의 표본을 만들어 총 400개의 정자를 카운트하여 생존율을 평가하였다.

5. 정자막 온전성 평가

정자막 온전성을 측정하기 위하여 Jeyendran 등(1984)의 방법을 변형하여 저삼투압 용액을 이용한 정자미부의 팽창 형태를 분석하였다(Hypo-Osmotic Swelling Test). 37°C의 저장액(150 mOsm/kg, 0.45% NaCl 용액) 1 ml에 정자 샘플 100 µl를 혼합하여 37°C에서 5분간 정지시킨 후 슬라이드 글라스에 도말하여 개체 당 2개의 표본을 만들어 표본 당 200개의 정자를 카운트하여 정자의 온전성을 평가하였다.

6. 침체막 변화 양상 측정

침체막의 변화 양상을 측정하기 위하여 Chlortetracycline (CTC) 염색법을 사용하였으며, 이 방법으로 정자의 수정능 획득과 침체막 변화 양상을 조사하였다. 정액을 400 ×g에서 2분간 원심분리하여 세척한 다음 500 µl의 PBS를 첨가하여 재부유시킨 다음 500 µl의 CTC 용액(750 µM CTC, 130 mM NaCl, 5 mM cysteine in 20 mM Tris buffer; pH 7.8)을 혼합하여 20초간 암실에서 상온 배양하였다. CTC의 반응을 고정시키기 위하여 10 µl의 12.5% glutaraldehyde solution(in 0.5M tris-buffer; pH 7.4)를 첨가하였다. 염색된 정액은 빛이 차단된 4°C에서 보관하였으며, 염색 후 24시간 이내에 관독하였다. 정자의 침체막 변화 양상의 관독은 Fraser 등(1995)의 분류를 따랐다 (Table 2).

7. 통계

통계 분석은 통계 분석 프로그램(SPSS Version 18.0)을 이용하였으며, glycerol 농도에 따른 동결 용해 후 정자의 활력 및 생존율과 예비 동결 조건에 대한 결과는 ANOVA를 이용하여 유의성을 검정하였다.

결 과

1. Glycerol의 농도가 정자의 활력, 생존율 및 정자막의 온전성에 미치는 영향

제주 흑우의 정자를 각기 다른 glycerol 농도에서 동결 보존 후 용해하였을 때 정자의 운동성 및 생존율에 관한 결과는 Table 3과 같다. 제주 흑우 정액의 동결을 위해 사용된 glycerol의 농

Table 3. Motility and survival rate of sperm according to different glycerol concentration

Glycerol concentration	Motility (%)	Survival (%)	Membrane integrity (%)
3%	27.5 ± 0.15 <sup>a</sup>	16.1 ± 5.52 <sup>a</sup>	12.13 ± 5.47 <sup>a</sup>
5%	55.0 ± 0.10 <sup>b</sup>	33.1 ± 5.19 <sup>b</sup>	21.94 ± 4.42 <sup>a</sup>
7%	72.5 ± 0.05 <sup>bc</sup>	43.9 ± 3.33 <sup>c</sup>	35.50 ± 6.84 <sup>b</sup>

<sup>a-c</sup> Values with different superscripts within column are significantly different by ANOVA ( $p < 0.05$ ). Data are presented as mean ± SD.

도에 따른 정자의 활력 및 생존성의 변화에 대한 결과로 7%의 glycerol을 사용하여 제주 흑우 정액을 동결하였을 때 동결 보존 후의 정자의 활력은 72.5±0.1%로 유의적으로 높은 성적을 나타냈으나( $p < 0.05$ ), 5% 첨가와 유의적 차이를 나타내지 않았다. 동결 용해 후 생존률에 있어서 활력과 마찬가지로 7%의 glycerol을 사용하였을 때 43.9±3.3%로 유의적으로 높은 결과를 나타냈다( $p < 0.05$ ). 또한 저장액 팽창 실험으로 나타난 정자의 온전성 역시 7% 농도에서 35.50±6.84%로 유의적으로 높은 비율을 나타내었다( $p < 0.05$ ).

2. Glycerol 농도가 정자의 침체막 양상 변화에 미치는 영향

동결 용해 후 glycerol 농도에 따른 정자의 수정 능력 획득 양상 변화를 관찰한 결과는 Fig. 1과 같다. F pattern의 경우 7%의 glycerol 농도에서 유의적으로 가장 높은 비율을 나타냈으며( $p < 0.05$ ), 수정능 획득을 나타내는 B pattern의 비율은 7% 농도에서 유의적으로 낮은 비율을 나타냈다( $p < 0.05$ ). 그러나 침체 반응을 나타내는 AR pattern에 있어서는 첨가된 glycerol의 농도가 증가함에 따라 AR pattern의 비율이 감소하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

3. 예비 동결 조건이 정자의 활력, 생존율 및 정자막의 온전성에 미치는 영향

Table 4는 동결속도에 따른 정자의 활력, 생존율 그리고 정자막 온전성 변화에 대한 결과이다. 동결 용해 후 정자의 활

Table 2. Definition of sperm membrane pattern by CTC staining

Pattern	Description
F	Full fluorescence characteristic of ejaculated spermatozoa: Characteristic of uncapacitated sperm
B	Banded-indicative on capacitated spermatozoa and fluorescence only in the post acrosomal region: Characteristic of capacitated sperm
AR	Sperm showing a mottled green fluorescence over head or no fluorescence on the head: Characteristic of typical acrosome related spermatozoa

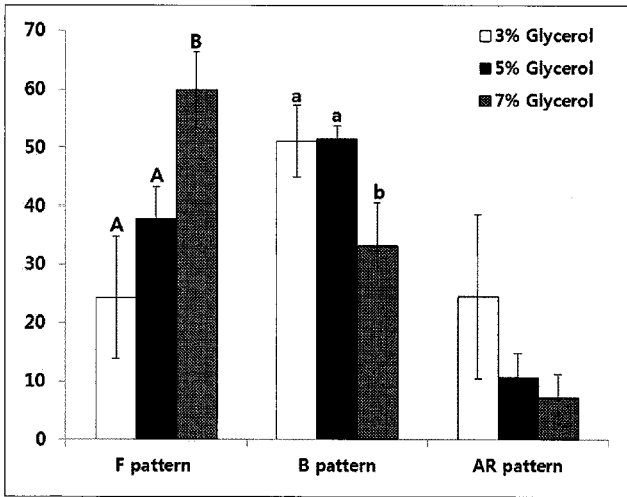


Fig. 1. Change of sperm capacitation status according to different glycerol concentration. <sup>A,B</sup> F pattern values for 3, 5, 7% glycerol concentration with different superscripts were significantly different by ANOVA ( $p < 0.05$ ). <sup>a,b</sup> B pattern values for 3, 5, 7% glycerol concentration with different superscripts were significantly different by ANOVA ( $p < 0.05$ ).

Table 4. Effect of straw-located height and duration above LN<sub>2</sub> at freezing on viability and motility of frozen-thawed Korean Jeju Black Bull semen

Height-min	Motility (%)	Survival (%)	Membrane integrity (%)
3 cm-5 min	68.75 ± 0.03	45.19 ± 0.92	35.19 ± 7.92
5 cm-10 min	75.00 ± 0.06	51.94 ± 4.10	41.19 ± 4.94
8 cm-10 min	75.00 ± 0.06	47.94 ± 5.17	40.94 ± 4.04

Data are presented as mean ± SD.

력, 생존율 그리고 정자막 온전성 모두 5 cm 높이에서 10분간 예비 동결 실험구에서 다소 높은 결과를 나타냈지만 유의적 차이는 볼 수 없었다.

4. 예비 동결 조건이 정자의 침체 양상 변화에 미치는 영향

Fig. 2는 예비 동결 조건이 동결 용해 후 정자의 침체 양상의 변화에 미치는 영향에 대한 결과이다. 동결 용해 후 정자의 침체막 양상을 살펴보고자 CTC staining을 시행한 결과, F pattern은 glycerol의 농도에 따라 그 비율이 증가하는 양상을 나타냈으며, B pattern의 비율은 5 cm 높이에서 10분 예비 동결한 실험구에서 다소 높은 비율을 나타냈으며, 8 cm 높이에서 10분간 예비 동결한 실험구에서는 3 cm 높이에서 5분간 예비 동결한 실험구보다 다소 높은 비율을 나타냈지만 3개의 실험구 모두 유의적 차이는 없었다. 그러나 AR pattern에 있어서는 3 cm 높이

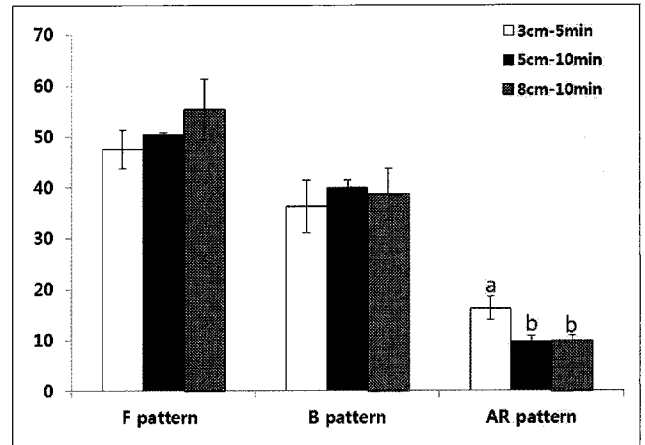


Fig. 2. Change of sperm capacitation status according to different pre-cooling condition. <sup>a,b</sup> AR pattern values for 3~5 min, 5cm-10 min and 8 cm-10 min with different superscripts were significantly different by ANOVA ( $p < 0.05$ ).

에서 5분간 예비 동결을 하였을 때 유의적으로 AR pattern의 비율이 증가함을 알 수 있었다( $p < 0.05$ ).

고 찰

동결이 진행되는 과정 동안, 세포는 그들의 삼투압이 급격하게 변하는 삼투압 공차를 겪어 그들의 용적이 변화되는 과정을 겪게 된다(Gilmore 등, 1998). 동결이 시작되면 얼음 결정이 세포질 안에서 핵 주변으로 모이며, 세포 안의 물을 세포질 밖으로 내보내게 된다. 만약 너무 빠른 속도로 냉각하여 세포 안의 수분을 배출해 내지 못한다면 결과적으로 세포막의 손상을 초래해 세포의 사멸을 가져오게 된다. 다양한 동결 보호제는 높은 삼투압을 이용하여 세포내의 수분을 효과적으로 세포 밖으로 빠져 나오게 하여 세포를 보호하는 역할은 수행한다(Mazur, 1984). 본 연구의 결과는 Rodriguez 등(1975)이 7%의 glycerol를 사용하여 Hereford 종의 정액을 동결하였을 때 가장 높은 성적을 거두었음을 보고한 바와 일치하고 있다. 또한 한우(이 등, 2003)와 쇠소(조 등, 2011)의 동결 정액 제조 시 7%의 glycerol 농도를 이용하여 좋은 성과를 보고한 바와 일치하는 것을 보여준다. 그러나 Guthrie 등(2002)은 정자의 활력과 생존율에 가장 좋은 효과를 보이는 삼투압은 약 350~400 mOsm/kg으로 1 M의 glycerol 농도를 사용하였을 때 높은 활력과 생존율을 보고한 바 있다. 이는 본 실험에 사용된 glycerol을 이용하였을 경우 약 9%의 농도로서 본 실험보다 다소 높은 농도의 glycerol 농도를 보고하고 있지만, 이는 사용된 희석액 및 동결법의 차이에 의한 것으로 사료된다. 또한 정자막의 온전성은 정자의 대사뿐만 아니라 난자와의 수정 및 정자의 수정능 획득과 침체 반응과도 밀접한 관계가 있어, 정자의

수정능을 평가하는데 유용한 지표로 사용되고 있다(Jeyendran 등, 1984; Hatasaka 등, 1990). 이러한 검사는 직접적으로 인공 수정을 시행하거나, 체외수정 방법을 통한 검사를 수행하는 것 보다 시간과 비용적인 면에서 절약할 수 있으며, 손쉽게 수정 능력을 예측할 수 있다. 특히 사람에서는 수정 능력 혹은 가임능력을 평가하기 위하여 정자막의 온전성을 검사하는 저장액에서 정자 미부의 팽창 패턴을 평가하여 그 수정 능력을 예측하고 있다(최 등, 1993). 본 연구의 결과, 동결 보호제의 농도는 정자의 동결에 있어 그 생존성과 활력 그리고 수정 능력에 중요한 요인으로서 기여하고 있음을 알 수 있다. 그러나 적절한 동결 보호제의 농도가 첨가되어 동결 정액을 제조할 경우, 예비 동결 속도와 높이는 정자의 활력, 생존성 그리고 수정 능력에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 개(이 등, 2003; 지 등, 2007)와 말(최 등, 2010)의 동결 정액 제조시 예비 동결의 높이가 정자의 활력과 생존율에 영향을 끼치며, AndroMed(Minitub, Germany)를 이용한 제주 흑우 동결 정액 제조시 예비 동결의 높이와 시간이 생존율에 영향을 끼친다는 보고(조 등, 2009)와는 다른 결과를 나타내었으나, 이 역시 사용되는 희석제 및 동결법의 차이에 의한 것으로 사료된다.

정자가 수정능 획득 및 침체 반응 시 칼슘 이온이 작용하는데, 정자 두부 특정 부위 내에 칼슘 이온의 존재를 antibiotic chlortetracycline 형광 물질로 측정하는 방법이 개발되고(Fraser 등, 1995), Kommissrud(2002)은 이 CTC 방법을 이용하여 수정능 획득 및 침체 반응과 수정 능력간의 관계를 보고하여 CTC를 이용한 정액 질에 대한 평가 가능성을 제시한 바 있다. 또한 Oh 등(2010)은 돼지 정자의 수정능 예측을 위해 CTC 방법의 사용은 수정 능력이 불량한 개체를 예측하는데 있어 유용하다고 보고한 바 있다. CTC를 이용한 정자의 수정능 획득을 측정하기 위해서 Fraser 등(1995)이 제시한대로 수정능 획득이 일어나지 않은 F pattern과 수정능 획득이 일어난 B pattern 그리고 침체 반응이 일어난 AR pattern으로 분류한다. 수정 전 정자는 F pattern과 B pattern의 비율이 높아야 하며, 인위적인 수정능 획득을 유도하지 않은 경우 F pattern의 비율이 높아야 한다(Fraser, 2004). Suzuki 등(2003)은 B pattern 정자와 인공 수정시 수정 능력 간에 직접적인 관계가 있어 이들의 비율이 정액의 질을 판단하는 척도로 사용될 수 있다고 제시한 바 있다. 수정능이 획득된 정자는 난자를 둘러싸고 있는 투명대에 의해 수정되기 전에 침체 반응이 일어나지만(Yanagimach, 1994), 난자의 투명대와 결합하기 전에 침체 반응이 일어난 정자는 난자의 투명대와 결합에 필요한 중요한 요소를 잃어버리기 때문에 정상적인 수정에 참여할 수 없다(Adeoya-Osi-guwa와 Fraser, 2004). 본 연구에서 7% glycerol를 사용하였을 때 유의적으로 높은 F pattern을 나타냈으나, B pattern은 가장 낮은 비율을 나타내었다. 이는 Suzuki 등(2003)이 보고한 B pattern

의 비율이 정액의 질을 판단하는 척도로 사용된다고 보고한 바와 상이한 결과를 나타내고 있으나, AR pattern을 살펴보면 또한 유의적으로 낮은 비율을 나타내고 있다. 정자에 있어 cold shock는 tyrosine phosphorylation에 변화를 주어 정자가 사실상 수정능이 획득되지 않았음에도 수정능 획득이 이루어진 것처럼 보이는 capacitation-like state를 유발한다(Bravo 등, 2005). 본 실험의 결과, 3%와 5% 농도의 glycerol 실험구에서 높은 B pattern의 비율은 cold shock에 의해 발생된 capacitation-like state로 사료된다. 또한 예비 동결의 높이와 시간에 따른 결과에서 3 cm, 5분간 예비 동결한 경우 F와 B pattern에는 큰 차이가 없었으나, AR pattern이 증가함을 나타내었다. 이러한 결과 역시 cold shock로 인한 조기 침체 반응이 발생한 것으로 판단된다. 이러한 조기 침체 반응은 난자의 투명대와 결합이 불가능하므로 인공수정 시 수정 능력이 떨어지는 정자가 될 수 있다. 즉, 동결 정액 제조 시 예비 동결의 높이와 시간은 정자의 생존율과 활력에는 큰 영향을 미치지 못하지만 정자의 수정능 획득에 있어 조기 침체 반응을 유도하여 수정 능력을 떨어뜨리게 하는 요인이 될 수 있음을 시사한다.

본 연구에서 제주 흑우의 동결 정액 제조시 7%의 glycerol 첨가가 높은 활력, 생존율 그리고 수정 능력을 유지시켰으며, 침체의 손상 역시 가장 적게 나타났다. 예비 동결 시 조건에 있어 모든 실험구는 정자의 활력, 생존율 그리고 수정 능력에 있어 어떠한 차이도 보이지 않았으나, 3 cm, 5 min 예비 동결 시 빠른 cooling으로 인한 침체 손상으로 조기 침체 반응을 유도하는 것으로 사료된다.

## 결론

최소 한우로 분류된 제주 흑우 동결 정액 생산과 동결 방법 확립을 통하여 제주 흑우 정액의 동결 보존과 이용성 증대 및 유전 자원의 보존성을 증대시키기 위하여 본 연구를 실시하였다. 제주 흑우의 동결 정액 제조 시 7%의 glycerol 첨가에서  $72.5 \pm 0.05\%$ 의 활력과  $43.9 \pm 3.33\%$ 의 생존율 그리고  $35.50 \pm 6.84\%$ 의 정자막 온전성을 나타내, 타 실험구에 비하여 높은 결과를 나타내었다. 또한 정자 침체막 양상 평가에 있어 7% glycerol 농도에서 수정에 필요한 정자의 비율이 높게 나타났다. 예비 동결 조건에 있어 높이와 시간은 정자의 활력, 생존율 그리고 정자막 온전성에 유의적인 영향을 나타내지는 않았으나, 3 cm, 5 min의 예비 동결 조건은 빠른 cooling으로 인한 침체 손실을 유발하여 조기 침체 반응을 일으키는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 본 연구에서 사용된 glycerol의 농도와 예비 동결 결과의 활용으로 최소 가축의 생식세포 및 유전 자원 보존을 위한 중요한 보존 방법이 될 것이며, 생존율과 운동성 증대를 위한 다양한 희석제를 활용한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 참고문헌

- Abdelhakeam AA, Graham EF, Vazquez IA and Chaloner KM. 1991. Studies on the absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen: Development of and extender for freezing: Effects of osmotic pressure, egg yolk levels, thpe of sugars, and the method of dilution. *Cryobiology* 28:43-49.
- Adeoya-Osiguwa SA and Fraser LR. 2004. Environmental estrogens and sperm function. *Hum. Reprod.* 19:216-217.
- Ahmad K, Foot RH and Kaproth M. 1987. Antibiotics for bull semen frozen in milk and egg yolk extenders. *J. Dairy Sci.* 70:2439-2443.
- Ahmad K and Foot RH. 1985. Motility and fertility of frozen bull spermatozoa in tris-yolk and milk extenders containing amikacin sulfate. *J. Dairy Sci.* 68:2083-2086.
- Blolodeau JF, Blanchette S, Cormier N and Sirard MA. 2002. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: Oritection by pyruvate, metal chelators and bovine liver of oviductal fluid catalase. *Theriogenology* 57:1105-1122.
- Bolten M, Weissbach L and Kaden R. 2005. Cryopreserved human sperm deposits: Usability after decades of storage. *Urologe A.* 44:904-908.
- Bravo MM, Aparicio IM, Garcia-Herreros M, Gil MC, Pena FJ and Garcia-Marin LJ. 2005. Changes in tyrosin phosphorylation associated with true capacitation and capacitation-like state in boar spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 71:88-96.
- Curry MR, Millar JD and Watson PF. 1990. Calculated optimal cooling rates for ram and human sperm cryopreservation fail to conform with empirical observation. *Biol. Reprod.* 51:1014-1021.
- Fraser LR, Abeydeera LR and Niwa K. 1995. Ca<sup>2+</sup>-regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis. *Mol. Reprod. Dev.* 40:233-241.
- Gilmore JA, Liu J, Gao DY, Peter AT and Crister JK. 1998. Determination of plasma membrane characteristics of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. *Biol. Reprod.* 58:28-36.
- Guthrie HD, Liu J and Critser JK. 2002. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. *Biol. Reprod.* 67:1811-1816.
- Hammerstedt RH, Graham JK and Nolan P. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *J. Androl.* 11:73-88.
- Jeyendran RS, Van der Ven HH, Prez-Pelaez M, Carbo BG and Zaneveld LJ. 1984. Development of and assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fertil.* 70:219-228.
- Kommisrud E, Paulenz H, Sehested E and Greule IS. 2002. Influence of boar and semen parameters on motility and acrosome integrity in liquid boar semen stored for 5 days. *Acta. Veterinaria Scandinavia.* 43:49-55.
- Leibo SP and Bradley L. 1999. Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa. In: Gagnon. C. (ed.) *The Male Gamete: Basic Science to Clinical Applications*, Cache Raven Press. Vienna, pp. 501-516.
- Mazur P. 1984. Freezing of living cell: Mechanisms and implications. *Am. J. Physiol.* 247(3Pt1):c125-142.
- Oh SA, Park YJ, You YA, Mohamed EA and Pang MG. 2010. Capacitation status of stored boar spermatozoa is related litter size of sows. *Anim. Reprod. Sci.* 121:131-138.
- Polge C, Smith AU and Parkes AS. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164:666.
- Rodriguez OL, Berndtson WE, Ennen BE and Pickett BW. 1975. Effect of rates of freezing, thawing and levels of glycerol on the survival of bovine spermatozoa in straws. *J. Anim. Sci.* 41:129-136.
- Suzuki K, Geshi M, Yamauchi N, and Nagai T. 2003. Functional changes and motility characteristics of Japanese Black Bull spermatozoa separated by Percoll. *Anim. Reprod. Sci.* 77: 157-172.
- Swelum AA, Mansour HA, Elsayed AA and Amer HA. 2011. Comparing ethylene glycol with glycerol for cryopreservation of buffalo bull semen in egg-yolk containing extenders. *Theriogenology* 76:833-842.
- Vishwanth R and Shannon P. 2000. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim. Reprod. Sci.* 62:23-53.
- Watson PF, Crister JK and Mazur P. 1992. Sperm preservation: fundamental cryobiology and practical implication. In *Templeton, AA, Drife JO. (ed.), Infertility Springer London*, pp. 102-114.
- Yanagimachi R. 1994. Mammalian fertilization. In *Knobil E and Neill JD (eds). The Physiology of Reproduction 2nd ed.* Raven Press. New York, USA, pp. 189-317.
- 이명식, 박정준, 전기준, 정영훈, 우제석, 박수봉, 임석기, 연성흡, 손동수, 나기준, 강만중, 문승주. 2003. 한우의 생식세

- 포 보존에 관한 연구 I. 한우 정액의 일반 성상 및 동결 후 생존성에 미치는 영향. 한국수정란이식학회지 18:143-149.
- 이제협, 박 향, 박흠대, 김재명. 2003. 개 정자의 동결보존에 있어서 Glycerol 농도, 동결 및 용해 속도가 정자의 생존율 및 운동성에 미치는 영향. 한국수정란이식학회지 18:195-201.
- 조상래, 김성재, 손준규, 최선호, 최창용, 고응규, 이풍연, 김현중. 2011. 최소 정액 동결을 위한 AndroMed와 Tris-egg Yolk 희석제의 동결성 비교. 한국수정란이식학회지 26:65-70.
- 조상래, 최선호, 최창용, 손준규, 김재범, 김성재, 손동수, 김현중. 2009. AndroMed를 이용한 흑우 동결 정액으로 체외수정란 생산 효과. 한국수정란이식학회지 24:207-212.
- 지달영, 윤태중, 노정래, 조상래, 김창근, 방명걸, 김보숙. 2007. 풍산개 정자의 동결보존에 있어서 Glycerol 농도, 동결 및 용해속도가 정자성상에 미치는 영향. 한국동물자원과학회지 49:585-592.
- 최두석, 문신용, 장윤석. 1993. 남성 불임검사 중 정자 형태와 정자 운동성 검사 및 저장성용액 내 정자 팽창검사의 상관관계 및 가임능력 예측에 관한 연구. 대한산부인과학회잡지 36:2497-2509.
- 최선호, 김성재, 조상래, 최창용, 손준규, 유용희, 조영재, 최귀철, 문운영. 2010. 말 정액 동결시 glycerol 농도와 동결 속도가 생존율에 미치는 영향. 한국동물번식학회지 34:271-274.

---

(접수: 2011. 8. 8 / 심사: 2011. 8. 10 / 채택: 2011. 8. 30)