

돼지 인공수정용 액상정액의 품질에 대한 희석온도의 영향

사수진, 백선영, 정학재
농촌진흥청 국립축산과학원 양돈과
e-mail: soojinsa@korea.kr

Effect of dilution temperature on quality of fresh semen for swine artificial insemination

Soo Jin Sa, Sun Young Baek, Hak Jae Chung
Swine Science Division, National Institute of Animal Science, Rural Development
Administration

요약

돼지 인공수정은(AI; Artificial insemination)은 돼지 생산 시스템에서 번식을 위해 사용되는 주요한 수단이다. 돼지 정자는 세포막에 인지질 조성이 달라 타 축종에 비해 저온충격에 매우 민감하다. 인공수정용 제품정액은 수태지로부터 사출된 정액의 1차 희석한 후, 정액제조실에서 2차 희석을 거쳐 생산된다. 이 과정의 온도관리는 정자세포의 기능에 영향을 미치는 주요한 요인이다. 따라서 본 연구에서는 돼지 액상정액의 제조과정에서 2차 희석온도가 정액의 품질에 미치는 영향을 평가하였다. 두록 수태지 5두를 이용하여 수압법으로 정액을 채취한 후, 32℃로 가온된 희석액(BTS)으로 1차 희석을 실시하였다. 정액샘플은 세 그룹으로 나누어 각각 32℃, 26℃ 및 21℃ 온도의 희석액을 이용하여 2차 희석을 실시하였다. 그 후, 17℃ 정액보관고에서 보관하면서 일자별(채취당일, 1, 3, 5, 7 및 11일)로 정액의 품질을 평가하였다. 2차 희석온도(32℃, 26℃ 및 21℃)에 따른 정액의 품질변화를 평가한 결과, 21℃처리구에서 정자운동성이 낮은 경향을 나타냈으며, 11일차에서의 21℃처리구($38.9 \pm 2.1\%$)는 타처리구($59.0 \pm 4.3\%$, $51.6 \pm 10.1\%$)에 비해 유의적으로 낮은 정자 운동성이 관찰되었다. 정자의 원형질막온전성 또한 타처리구에 비해 21℃처리구에서 낮은 경향을 보였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 정자의 생존성은 보관 7일까지는 차이가 없었으나, 11일차에 21℃처리구($70.1 \pm 13.2\%$)에서 타처리구($88.4 \pm 5.1\%$, $90.9 \pm 5.9\%$)에 비해 유의적으로 낮았다. 정상침체율의 경우도 21℃처리구가 타처리구에 비해 낮은 경향을 보였다. 이러한 결과들은 액상정액 제조과정 중 2차 희석온도를 낮게(21℃ 처리구) 처리한 경우 정액의 보존기간이 길어짐에 따라 정액품질이 저하되었다. 액상정액 제조시 희석제를 미리 가온(32℃, 36℃)하여 사용할 경우 생산비용이 다소 증가할 수 있다는 단점이 있으나, 제품정액의 보존성과 상품성 개선을 위해서는 효과적인 방법인 것으로 판단된다.

.색인어 : 돼지, 인공수정, 액상정액, 희석온도, 품질평가

서론

돼지 인공수정은(AI; Artificial insemination)은 대부분의 집약적인 돼지 생산 시스템에서 번식을 위해 세계적으로 사용되는 주요한 수단이다. 양돈산업에서 인공수정에 의한 번식의 비율은 90%에 달하며, 액상의 형태로 희석된 신선정액이 사용된다[1, 2].

돼지 정자는 세포막에 인지질 조성이 다르기 때문에 타 축종에 비해 저온충격에 매우 민감하다[3]. 정액제조 과정의 희석 및 온도조절 관리는 정자세포의

기능에 영향을 미치는 주요한 인자이다. Althouse 등 (1998)은 돼지 정액이 12℃에서 심각한 저온충격을 받는다고 보고했다.

인공수정용 돼지정액은 2단계의 희석과정을 거쳐 제품정액으로 생산된다. 수태지로부터 사출된 정액을 약 32℃로 가온된 희석액을 이용해 1:1 비율로 1차 희석을 실시한 후, 정액제조실로 이동하여 32℃로 가온된 희석액 또는 21~24℃ 실온상태의 희석액을 이용해 2차 희석을 실시한다[4]. 2차 희석을 마친 정액은 포장용기에 담겨 15~17℃ 온도조건하에서 보관 및

유통된다. 미리 가온된 희석제를 이용한 2차 희석과정은 돼지인공수정센터에서 비용과 노동력을 증가시키지만, 이 방법이 제품정액의 품질에 긍정적인 영향을 미치는지는 명확하지 않다[5, 6].

따라서 본 연구에서는 돼지 인공수정용 액상정액의 제조과정에서 2차 희석온도가 제품정액의 품질에 미치는 영향을 평가하였다.

재료 및 방법

정액준비

본 연구는 국립축산과학원 동물 실험 윤리 규정에 준해 수행되었다. 연구에 사용된 동물은 생후 12-24개월령 두록(Duroc) 수돼지 5두를 이용하였으며, 수압법을 통해 신선한 정액을 채취한 후, 32℃로 가온된 beltsville thawing solution(BTS; KRUUSE)을 이용해 1:1(vol/vol)의 비율로 1차 희석을 실시하여 실험실로 운반하였다.

실험실로 운반된 정액샘플은 세 그룹으로 나누어 32℃, 26℃ 및 21℃로 설정된 정액보관고에 30분 동안 배양을 실시한 후, 각각 32℃, 26℃ 및 21℃ 온도의 정액희석액(BTS)를 이용하여 2차 희석을 실시하였다. 2차 희석을 마친 정액샘플은 17℃ 정액보관고에서 보관하면서 일자별(채취당일, 1, 3, 5, 7 및 11일)로 정액의 품질을 평가하였다. 정액샘플의 최종농도는 30×10^6 sperm/ml로 맞추었다.

정자의 운동성 분석(sperm motility assay)

정자의 운동성은 정자운동성 자동분석장치(CASA; Computer-Assisted Sperm Analysis, ISAS Psus®)를 사용하여 평가하였다. 정자샘플은 돼지정액 희석액(BTS)으로 30×10^6 cells/ml의 농도로 조정하여 분석했다. 38℃로 가온된 정자샘플 5μl를 markler counting chamber(Sefi-Medical Instruments, Israel)와 CASA를 사용하여 샘플 당 최소 100마리의 정자를 평가하기 위해서 10회 이상 분석을 반복하여 데이터를 수집하였다.

저장액 내 정자팽창시험(HOST; hypoosmotic swelling test)

100 mmol의 저삼투성 sucrose 용액 100μl에 정액 10μl를 첨가하여 정자의 저삼투압 팽창테스트(HOST)를 수행하였다. 1.5ml 튜브에 담긴 정액샘플은 38℃에서 5분간 배양되었다. 배양을 마친 정액샘

플 10μl를 슬라이드글라스에 도말하여 400배율의 위상차현미경 하에서 분석을 실시하였다. 정자의 특징적인 말립 또는 감김으로 검사에 반응한 정자의 비율을 조사하였다.

정자 생존성 평가(Sperm viability assay)

생존정자와 사멸정자의 비율은 eosin-nigrosin 염색에 의해서 평가되었다. 10μl의 정액샘플을 2% eosin G 10μl 및 4% nigrosin 용액 20μl와 혼합하여 슬라이드글라스에 도말하여 공기 중에 건조시킨 다음 400배율의 위상차현미경 하에서 분석을 실시하였다.

정자 첨체온전성 평가(acrosome integrity assay)

정액샘플을 슬라이드글라스에 도말하여 실온에서 5분 동안 Spermac kit(Minitube)에 포함된 포르말린 용액(Fixative sol.)에 담근 후, 공기 중에서 건조시켰다. 정자가 고정된 슬라이드는 수돗물로 세척하고 염색액 A, B 및 C에 각각 1분씩 담갔다가 수돗물로 세척하는 방식으로 염색을 실시하였다. 염색된 슬라이드는 10분간 공기 중에 건조시킨 후 immersion 오일을 침지하여 1,000배율의 위상차현미경 하에서 분석을 실시하였다.

통계 분석

본 연구에서의 통계분석은 R 3.6.1 version을 이용하였으며, 3가지 이상의 변수의 차이는 ANOVA를 이용하여 분석하였다. 사후검증으로 Duncan의 multiple range test방법을 이용하였다. 집단 간 평균의 차이는 t-test를 이용하였다. 모든 검정은 유의수준 5% 이하로 수행하였다.

결과

돼지 인공수정용 액상정액의 제조과정에서 2차 희석온도(32℃, 26℃ 및 21℃)에 따른 정액의 품질변화를 평가한 결과, 21℃처리구에서 정자운동성이 낮은 경향을 나타냈으며, 11일차에서의 21℃처리구($38.9 \pm 2.1\%$)는 타처리구($59.0 \pm 4.3\%$, $51.6 \pm 10.1\%$)에 비해 유의적으로 낮은 정자 운동성이 관찰되었다. 정자의 원형 질막온전성 또한 타처리구에 비해 21℃처리구에서 낮은 경향을 보였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다(Table 1). 정자의 생존성은 보관 7일차까지는 차이가 없었으나, 11일차에 21℃처리구($70.1 \pm 13.2\%$)

에서 타처리구($88.4 \pm 5.1\%$, $90.9 \pm 5.9\%$)에 비해 유의적으로 낮았다. 정상첨체율의 경우도 21°C 처리구가 타처리구에 비해 낮은 경향을 보였다(Table 2). 이러한 결과들은 인공수정용 돼지 액상정액 제조과정 중 2차 희석온도를 낮게(21°C 처리구) 처리할 경우 정액의 보존기간이 길어짐에 따라 정액의 품질의 저하가 관찰되었다. 액상정액 제조시 희석제를 미리 가온(32°C , 36°C)하여 사용할 경우 생산비용이 다소 증가할 수 있다는 단점이 있으나, 제품정액의 보존성과 상품성 개선을 위해서는 효과적인 방법인 것으로 판단된다.

Table 1. Effects of second dilution temperature on sperm motility and HOST of boar semen doses

Parameter	Second dilution temperature ($^\circ\text{C}$)	Storage					
		D0	D1	D3	D5	D7	D11
Sperm motility(%)	32	85.7 ± 3.1	82.5 ± 0.3	79.0 ± 0.6	80.6 ± 3.0	82.2 ± 2.5	59.0 ± 4.3
	26	84.5 ± 3.8	85.7 ± 1.9	80.8 ± 2.2	79.3 ± 0.2	80.7 ± 0.2	51.6 ± 10.1
	21	83.6 ± 2.7	83.1 ± 1.7	81.4 ± 1.4	80.6 ± 1.8	76.5 ± 0.9	$38.9 \pm 2.1^*$
HOST(%)	32	95.0 ± 2.8	97.4 ± 1.5	98.0 ± 0.4	80.0 ± 2.1	83.3 ± 4.0	81.7 ± 3.5
	26	95.2 ± 1.2	95.2 ± 1.3	97.1 ± 1.8	79.1 ± 3.9	89.4 ± 0.6	83.2 ± 2.4
	21	94.9 ± 1.8	94.9 ± 1.7	95.1 ± 3.0	76.4 ± 4.0	89.0 ± 5.8	75.4 ± 3.5

Ejaculates were first diluted(1:1) with BTS extender at 36°C . Second dilution was used with preheated BTS extender(32°C , 26°C) or room temperature(21°C). Samples were stored in a refrigerator(17°C) from D0 to D11.

* $P < 0.05$. HOST(hypoosmotic swelling test)

Table 2. Effects of second dilution temperature on sperm viability and acrosome integrity of boar semen doses

Parameter	Second dilution temperature ($^\circ\text{C}$)	Storage	
		D7	D11
Sperm viability(%)	32	87.2 ± 1.6	88.4 ± 5.1
	26	85.3 ± 7.7	90.9 ± 5.9
	21	87.9 ± 0.6	$70.1 \pm 13.2^*$
Acrosome integrity(%)	32	86.8 ± 8.4	71.3 ± 7.2
	26	86.4 ± 7.4	72.5 ± 2.2
	21	75.8 ± 7.8	66.0 ± 7.0

* $P < 0.05$

참고문헌

- [1] Riesenbeck A., "Review on international trade with boar semen". Reproduction in Domestic Animals. Vol.46, pp. 1-3, 2011.
- [2] Johnson LA et al., "Storage of boar semen". Animal Reproduction Science. Vol.62, pp.143-172, 2000.
- [3] De Leeuw F et al., "The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury". Reproduction in Domestic Animals. Vol.1, pp.95-104, 1990.
- [4] Waberski D., "Critical steps from semen collection to insemination". Proceedings Annual Meeting of EU-AI-Vets, Ghent; pp.66 - 69, 2009.
- [5] Waberski D., "Critical steps from semen collection to insemination. Proceedings of the Annual Meeting of the EU-AI-Vets, Ghent, Belgium. pp.66-69, 2009.
- [6] Lopez A et al., "Effect of dilution temperature on boar semen quality". Reproduction in Domestic Animals. Vol.47, pp.63-66, 2012.