

冷凍精液 融解方法이 精液性狀과 受胎에 미치는 影響

第1報 稀釋液別 融解方法과 保存時間이 精液性狀과 受胎에 미치는 影響

金 重 桂

Effect of Motility after rapid and slow Thawing in Bovine Frozen Semen

I. Effect of Thawing Method on Sperm Motility and Fertility in the Various Extenders

Kim, Jung Kye

Summary

This study was conducted in order to determine the effect on sperm motility after rapid and slow thawing of semen in various diluents, and the fertility for a period of 24 hours after thawing semen in ice water (5°C). 400 cows of Korean native cattle first services were inseminated with semen in tris-extender. Experimental results obtained are summarized as follows; sperm survival index that of bull semen suggested that much faster thawing rate may be superior to of slow in ampoules having not relation with thawing temperature, however these were no significant differences. Tris-extender, composed of fructose, glucose and glycine gain better results than egg-yolk citrate and dry skim-milk extender. The 150 day NR rate for the periods of 0-1 hour, 2-24 hours and over 24 hours after thawing semen in iced water were 61.5%, 59.9%, and 54.5% respectively. It showed that conception rate during 24 hours after thawing semen in iced water was not decreased at all, therefore, water maintained at 5°C (ice water) was the easiest and most practical method for the thawing semen.

I. 序 論

哺乳動物 또는 家禽의 精液을 長期間保存시키기 위해서 오래前부터 (Johnol 1938과 Shettle 1940) 試圖되었으며 英國의 Polge *et al* (1952)에 依해서 牛의 冷凍精液의 成功 以後 世界各國에서 많은 發展이 이루어져 우리나라에서도 1974년부터 液狀精液에서 冷凍精液으로 漸次로 轉換되어 가고 있는 實情이다.

그러나 아직도 曖昧한 點이 있는바 이 中에서도 凍結精液의 融解後 保存時間에 따른 受胎率의 關係는 稀釋液, 融解方法, 그리고 融解後 保存方法 等에 따라서 달라질수 있으므로 發表學者間 많은 差異點을 찾아볼 수 있다.

稀釋液에 따른 融解方法의 精液性狀 比較에 關한 試驗은 거의 찾아 볼 수 없으나 Aamdal(1968)은 lactose-yolk-glycerol液과 skim milk-fructose-glycerol稀釋液間에는 差異가 없었다고 報告하고 低溫水보다 高溫水75°C(7秒)에서 融解시킨 것이 좋았다고 함으로서 高溫融解方法이 試圖되어 Almquist(1974)은 heated skim milk 稀釋液을 Zegorski(1974) 역시 Pellet semen으로 Saacke(1975)는 egg-yolk-citrate稀釋液을 使用함으로써 融解速度가 빠른수록 精液性狀이 좋았다고 報告하고 있으나, Wiggin *et al* (1975)은 heated skim milk稀釋液에서 76°C溫水까지는 좋았으나 그 以上은 높은 融解溫度는 좋지 않은 것은 提示하였다.

融解後 保存時間에 따른 精液性狀과 受胎率 比較를 調査하여 보면 中山等(1975)은 4°C 또는 40°C 融解後 保存時間이 經過되면 共히 精液性狀과 頭帽異常率이 漸次로 增加함을 報告하였고 小形等(1967), 白井等(1968), 光井等(1971)은 4°C 融解後 保存時間 10~12 時間까지는 受胎率이 떨어지지 아니하였음을 發表하고 있으며, 入水等(1972)도 精液性狀이 48~50% 이던것이 保存 24時間은 43%, 48時間 35~38% 그리고 72時間까지 30~33%로 若干씩 떨어졌으나 受胎率은 保存 48 時間까지 66.2%로 利用可能性을 報告하고 있다.

그러나 우리나라는 아직까지 交通手段은 勿論, 人工授精師가 携帶用 液體窒素 container 를 經濟的 原因으로 거의 갖추지 못하고 있어 融解後 保存時間에 따른 受胎關係가 牛의 受胎率 向上에 큰 影響을 주고 있기 때문에 더욱 重大한 課題인 것이나 아직 우리나라에서는 그렇게 많은 試驗이 이루어지지 아니 하였다. 그러므로 本 試驗은 稀釋液別 融解溫度에 따른 精液性狀과 融解後 保存時間이 經過함으로써 韓牛에 授精시켜 受胎率에 미치는 影響을 究明하고, 適正時間을 決定하여 一線에서 努力하는 人工授精師와 畜主 等에게 簡便한 方法과 經濟的利益을 주고져 試圖되었다.

II. 材料 및 方法

1. 供試材料

精液性狀 檢査에 利用될 種牡牛는 畜産試驗場에서 飼育하고 있는 韓牛와 Holstein種牡牛를 利用하였으며 受胎率 調査用 供試實畜은 京畿道 水原市 梧木川洞一帶의 農家 韓牛에 1回 授精을 實施하여 妊娠된 家畜을 調査하였다.

Table 1. Sperm survival index in relation to the storage hours after thawing rate for egg-yolk citrate extender in pellet semen.

Thwing temp.	Storage hours after thawing (hr)					Mean
	0	24	48	60	72	
2-5°C	12.5	37.5	31.3	22.5	14.2	29.6
15-20°C	41.3	38.8	32.5	22.5	15.8	25.6
36-40°C	41.3	35.0	31.3	20.8	15.8	28.8
55-60°C	46.3	41.3	35.0	24.2	17.5	32.8

egg-yolk-citrate 稀釋液에 있어서 融解後 保存時間에 따른 錠劑化 凍結精液의 精液性狀 比較는 Table 1 에 記載된 바 같이 2~5°C 氷水에 融解 即時 精液

2. 試驗方法

가. 稀釋液製造: 稀釋液은 畜産試驗場에서 金等(1971)이 開發한 Tris-fructose extender(TFG)로서 tris-aminomethane 3.028%, citric acid 1.78%, glycine 0.48%, (fructose 0.3%, glucose 0.3%로 pH6.75로 固定하였으며 蒸溜水에 잘 녹혀 glycerol과 抗生劑를 添加하여 冷藏庫에 넣어 침전물을 除去시킨 후 사용하였으며, egg-yolk citrate extender(EYC)는 sodium citrate 2.9%와 卵黃 25%에 glycerol과 抗生劑를 첨가하였으며 dry skim milk extender(SDM)은 脫脂粉乳 10%를 蒸溜水에 녹혀 100°C에서 重湯으로 10分間 加熱시킨후 식혀서 抗生劑와 glycerol을 첨가하여 製造하여 利用하였다.

나. 精液凍結方法: glycerol 添加는 簡易方法에 依하였고 glycerol 評衡時間은 6時間 갖춘후 凍結시켰으며, 精液凍結은 液體窒素 gas로 急速凍結(55分)시켜 液體窒素 container에 保存하였다가 利用하였다.

다. 融解方法: 融解方法은 여러가지 方法이 있으나 氷水에 融解시키는 것과 40°C 溫水에 融解하는 方法, 55~60°C의 高溫融解方法 그리고 5°C 冷藏庫에 그대로 放置시켜 融解시키는 方法 等을 利用하여 融解後 保存時間別로 一定한 時間에 精液性狀을 檢定하였다.

라. 精液性狀 檢定: 融解된 精液은 即時 5°C 氷水에 保存하면서 38°C顯微鏡(200~400倍)에서 一定한 時間으로 精液性狀을 比較하여 精子生存指數로 換算하였다.

$$\text{精子生存指數} = \frac{(\text{卅} \times 100) + (\text{卅} \times 75) + (\text{+} \times 50)}{100}$$

III. 結果 및 考察

1. 融解方法에 따른 精液性狀

性狀은 精子生存指數 42.5이던 것이 24時間에는 37.5, 48時間 31.3으로 保存 2日까지 授精可能 精液性狀이었으나 保存 60時間과 72時間 保存함으로써 各各 22.5,

14.2%로 急激히 떨어졌으며, 15~20°C와 38~40°C(溫水) 融解時는 氷水와 거의 비슷하였으며, 保存 48時間까지는 대체로 授精可能性을 보여 주었으며 55~60°C 融解가 上記 方法中 가장 좋은 精液性狀을 나타내어 保存 48時間이 35.0로 生存指數가 높았으며 平均値를

보더라도 55~60°C 融解가 32.8로 가장 높은 數値였고 다음 2~5°C, 38~40°C, 15~20°C 融解方法 順位를 나타내었다.

그리고 dry skim milk extender 인 境遇 Table 2 와같이 各 融解方法 共히 保存 24時間까지 授精可能生

Table 2. Sperm survival index of the storage hours after thawing rate for skim-milk-extender in pellet semen.

Thawing temp.	Storage hours after thawing (hr)					Mean
	0	24	48	60	72	
2-5°C	37.5	35.0	26.3	17.5	15.8	26.4
15-20°C	35.0	28.8	18.8	14.2	14.2	22.2
38-40°C	37.5	32.5	23.8	14.2	7.0	23.0
50-60°C	38.3	34.5	25.0	12.0	7.0	23.5

Table 3. Sperm survival index in relation to the storage hours after thawing rate for tris-buffer extender in pellet semen.

Thawing temp.	Storage hours after thawing (hr)					Mean
	0	24	48	60	72	
2-5°C	48.8	46.3	41.3	32.5	24.2	38.26
15-20°C	45.0	42.5	38.8	30.8	20.8	35.58
38-40°C	47.8	47.5	41.3	34.2	24.2	39.0
55-60°C	48.8	46.3	40.0	35.8	24.2	39.02

存指數를 보였으며 保存 48時間 부터는 30.0 以下로서 egg-yolk citrate extender 보다 빨리 精液性狀이 떨어짐을 보여주고 있으며 平均値로 보면 2~5°C 融解가 26.4로 가장 좋았으며 다음 55~60°C, 38~40°C, 15~20°C 融解方法의 順位였으며 氷水融解는 保存當日에 高溫融解보다 生存指數가 낮았으나 保存 72時間에는 오히려 더 좋았다.

Table 3에서 보여 주듯이 Tris. extender(TFG)의 旋劑凍結精液 融解方法에 있어서 2~5°C 融解 即時 精子生存 指數가 48.8로 他稀釋液보다 높았으며 保存 60時間이 32.5로 高溫融解(60°C)의 境遇인 35.8보다若干 떨어졌으나 40°C 融解와 함께 큰 差異가 보이지 아니하였고 常水融解도 他 融解 方法보다 若干 떨어지는 傾向이었으나 一般적으로 保存 60日 까지 30.0以上으로 有意差는 없었다. 이를 綜合적으로 본다면 대체로 高溫融解가 若干 低溫融解보다 良奴한 精液性狀을 보여 Almquist(1964), Zagorski(1974), Saacke(1975) 등과는 큰 差異가 없었고 一致하는 傾向을 볼수 있는 反

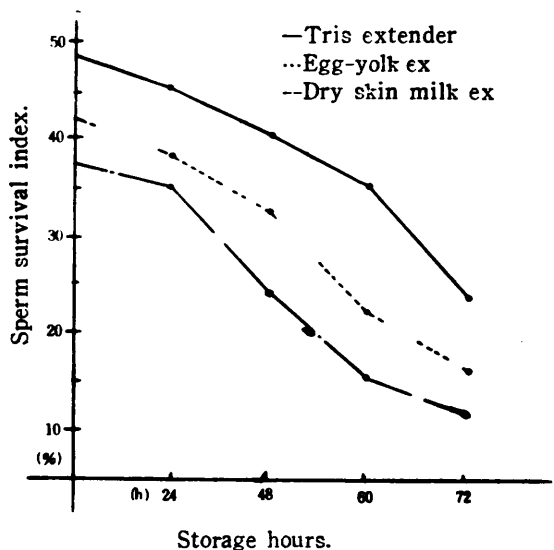


Fig1. Comparison of sperm motility after thawing rate among extenders.

Table 4. Sperm survival index for thawing methods and storage hours after thawing between warmed and iced water in ampoules.

Breeds	Thawing temp.		5°C water					40°C water				
	Storage hours		0	12	24	36	48	0	12	24	36	48
Korean native cattle			42	39	33	29	25	44	38	36	31	26
Angus			49	47	37	34	31	48	46	37	32	30
Holstein			43	42	36	31	38	44	42	35	31	27

Table 5. Sperm survival index of storage hours after thawing and leave the ample in room temperature and icebox.

Breeds	Thawing method		Leaving in icebox (5°C)					Leaving in room temp. (20—25°C)				
	Storage hours		0	12	24	36	48	0	12	24	36	48
K. cattle			40	34	31	25	21	43	42	28	24	22
Angus			42	40	31	27	22	44	42	32	26	24
Holstein			38	35	26	22	19	40	38	30	23	20

面 森木等(1973), Senger et al(1976)等과는 相反되는 結果를 보여주고 있다.

그리고 稀釋液間에는 Fig1과 같이 Tris. extender (TFG)가 가장 좋은 成績을 나타냈고 다음 egg-yolk citrate 와 dry skim milk extender의 順位로서 精液性狀이 떨어졌음을 보여주어 稀釋液間에 差異性이 나타나어 Aamdal(1968)과는 一致하지 아니하였으나 Heydorn et al(1974)의 Tris. extender가 skim milk extender보다 좋았다고한 報달와 一致하였다.

種牡牛 品種別 氷水(5°C)와 溫水(40°C) 融解後 保存 時間別 ampoule의 精液性狀을 比較 한것은 Table 4에 表示된 바와 같이 種牡牛 品種에 따라서 若干씩 差異가 보이고 있으나 큰 差異없이 다만 精液採取 및 處理 方法에 依한것으로 볼 수 있으며 平均値로 본다면 Angus, Holstein 韓牛의 順位 였었다.

融解方法에 따른 氷水融解는 融解 即時 精子生存指數가 44.7 이던것이 12時間後 42.7로 若干 떨어졌으나 24時間에는 35.3으로 크게 떨어져 保存 36時間에는 31.3임으로 授精限界線으로 떨어져고 保存 48時間에서 28.0로 되어 授精不可能 狀態로 下降하였으며 溫水(40°C) 融解는 45.3이던 것이 保存 12時間에서는 42.0, 24時間은 36.0으로 떨어졌으며, 36時間에 31.3, 保存 48時間이 27.7로서 氷水와 거의 같은 狀態로 精液性狀이 낮아졌음으로 Hafs(1954)의 報告와 一致하지 아니 하였으나 VanDemark(1957)와는 一致하는 傾向

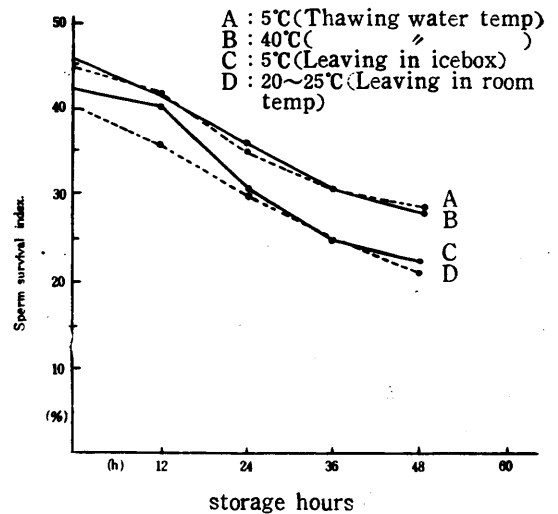


Fig2. Comparison of sperm survival index after various thawing methods.

을 보였다.

그러나 冷藏庫나 室溫(26°前後)에 放置하여 融解한 것은 Table 5에서 보여 주듯이 大體로 氷水나 溫水인 境遇보다 낮은 結果를 보이고 있다.

Table 5에 依하면 冷藏庫內 放置시킨 融解即時의 精子生存指數는 40.0로 처음부터 精液性狀이 떨어졌으며 保存 12時間 36.3, 保存 24時間에서 29.3으로 이미

授精不能 狀態이며, 保存 48時間에는 20.7로 가장 나쁜成績이었고 室溫內(20°C) 放置 融解는 冷藏庫 放置 보다는 若干 좋았으나 水中에서 融解한 것보다는 상당히 떨어지는 數値로서 保存 24時間에 30.0로 겨우 授精可能 生存指數였고, 保存 48時間에서는 冷藏庫放置 보다는 若干 좋았으나 22.0으로서 나쁜 精液性狀을 나타내고 있다.

Table 4, 5를 比較해 보면 融解溫度와는 關係없이 融解時間이 짧고 긴것에 크게 影響을 미치는 것을 알 수 있다. (Fig2) 即 溫度의 有害溫度인 -15~-30°C 에서 期間이 오랫동안 持續되면 이에따라 精液性狀이 떨어짐을 보여줌으로써 이 有害溫度 領域을 빨리 通過

시키는 條件이 必要함을 立證하여 줌으로써 高溫融解가 좋았다는 Hafs(1954), Aamdal(1968), Almquist (1974), Saacke(1975), Wiggin et al(1975)와 거의 一致함을 보여 주었다.

2. 融解에 따른 受胎率

稀釋液別 氷水融解方法에 따른 受胎率調查는 Table 6과 같이 egg-yolk-citrate extender로 授精시킨 韓牛는 95頭中 59頭가 受胎(150 day N.R)됨으로써 62.1%의 受胎率을 얻어 skim milk extender의 112頭授精牛 中 64頭를 受胎시킨 57.2%보다 若干 높은 指數(108)를 보여 주었고, tris-extender에 依한 受

Table 6. Comparison of the fertility after thawing iced water with various extenders in Korean native bull.

Extenders	No. of serviced	No. of conceived ^{Z)}	Fer
Egg-yolk ex.	95	59	62.1
Skim milk ex.	112	64	57.2
Tris fuffer ex.	138	83	63.0
Total or Mean	345	211	60.7

*Z): 150 day NR rate Table

Table 7. Fertility of frozen semen on the storage hours after thawing.

Storage hours(hr)	0-1	1-11	12-24	24-48
No. of serviced	26	16	3	11
No. of conceived	16	.9	2	6
Unknown conception	1	1	0	0
Fertility Z)	61.54	56.25	66.07	54.55

*Z): 150 day NR rate

胎率은 63.0%(138頭)를 얻음으로써 가장 受胎率이 높았으나 相互 有意性은 없었다. 이러한 結果는 前述한 바같이 稀釋液別 融解後의 精液性狀과 거의 同一한 順位를 보여 줌으로써 Aamdal(1968)과 거의 一致하였다고 볼 수 있다.

그리고 氷水融解後 保存時間에 따른 受胎率 調査는 Table 7의 成績에서 보여주듯이 融解即時 授精시킨 26頭中에서 16頭가 妊娠되어 受胎率 61.5%인데 反하여 融解後 1時間부터 11時間 保存後의 受胎率은 16頭授精에서 56.3%로서 若干떨어지는 傾向을 보였으며 保存 12時間에서 24時間까지의 受胎率이 66.6%(3頭中)로 적은 數로서 信賴性은 없더라도 保存 24時間까

지 受胎率이 그렇게 떨어지지 아니하였음을 나타내어 준데 反하여 保存 24時間에서 48時間 保存後의 受胎率은 54.5%(11頭中)로서 確實히 保存 2日 以後는 受胎率이 떨어져 감을 提示하여 주었다. 이러한 結果로 보아 氷水融解後 保存 24時間까지는 授精利用 可能性을 보여줌으로써 入水 等(1972)의 保存 48時間보다 길지 못하였으나, 小形等(1967) 白井 等(1968) 그리고 光井 等(1971)의 報告보다는 長期間 使用할 수 있음을 示唆하였다.

IV. 摘 要

冷凍精液 稀釋液別 融解方法과 保存時間에 따른 精液

性狀과 受胎率에 미치는 影響을 究明하기 위하여 韓牛 400頭로 Tris稀釋液을 5°C融解시킨 精液으로서 授精시킨 結果를 보면 精液性狀에 있어서 融解溫度에는 關係 없이 融解速度가 빠르면 어느 限界까지 精液性狀이 若干 좋았으나 有意差는 없었다. 그리고 稀釋液에서는 Tris-extender(TFG)가 第一優秀하였으며 氷水融解

時(5°C) 保存 24時間까지는 受胎率 低下를 보이지 아니하였다.

그러므로 5°C融解시켜 貯藏시키면서 適當時期에 授精시키는 方法은 取級하기 容易하고 가장 實用的인 方法이라고 生覺한다.

引 用 文 獻

- Aamdal, J. and K. Andersen, 1978. Fast thawing of semen frozen in straws. *Zuchthygiene*, 3;22-24(Eng. with Ger. Summ)
- Almquist, J.O. and H.B. Wiggin, 1973. Effect of different combination of freezing and thawing rates upon survival of bull spermatozoa in US plastic straws. *A.I Digest* 21:(9) 10~11.
- 入水壯, 大竹通男, 菊地武昭, 山下清一, 和出靖, 1972. 細型 straws에 依한 融解後 保存精液의 受胎試驗成績, 凍結精液研究會 會報 No. 37, 3~4.
- Hafs, H.D. and F.I. Elliott, 1954. Effect of thawing temperature and extender composition the fertility of frozen bull semen. *J. Animal Sci.*, 13;959.
- Heydorn, K.P. and S. Paufler, 1974. Studies on deep freezing of bull semen in pellet using various diluents and various thawing solution. *A. B. A.* 42, 10. 4269.
- 光井武, 高尾登, 豊田繁正, 小割利美波, 邊滋樹, 1971. 牛凍結 精液 融解後의 保存時間과 受胎成績 凍結精液研究會 會報 No. 35. 24~25.
- 白井節造, 西村 實, 竹居宏 五味川潔, 1968. 分離 straw에 依한 窒素 gas 簡易 凍結精液의 融解後의 保存期間別 受胎試驗成績. 凍結精液研究會會報 No. 24; 15~16.
- 加藤征史郎, 井上陽一, 廣野森, 入谷明, 西川義正 1976. 凍結豚精子の 運動性 및 頭帽의 形態에 미치는 影響. 凍結精液研究會會報. No. 48; 15~19.
- 小形忠司, 惟子功, 原島昇立, 古川平吉, 植木拓稱 1967. Sub center 融解法의 實用性에 關하여, 凍結精液研究會會報 No. 23; 11~12.
- 材木一三, 佐佐仁兵治, 菅原恒産, 土橋達城, 1973. 牛凍結精液의 融解方法別 受胎成績, 凍結精液研究會會報, No. 40;4~6.
- Saacke, R.G., R.K. Robbins and P.T. Chandler, 1975. Effect of freeze rate thaw rate and glycerol level on bovine sperm frozen in straws. In Proceeding of the Fifth Technioal Conference on Artificial Insemination and Reproduction, Chicago. February, 15~16, Colombin, U.S.A.
- Senger, P.L., N.C. Becker and J.K. Millers, 1976. Ffect of thawing rate and post-thaw temperature on motility and acrosomal maintenance in bovine semen frozen in straws. *J. Animal Sci.*, 4:932.
- Wiggin, H.B. and J.O Almquist, 1975. Combinations glycerol percent, glycerol equilbration time, and thawing rate upon freezability of bull spermatozoa in plastic straws. *J. Dairy Sci.*, 58; (3);416~419.
- Zagorski, D., B. Dimitrov, and S. Ivanova, 1974. Comparison of different temperatures for thawing deep-frozen bull semen. *A. B. A.* 42; (10):4305.