

碩士學位論文

돼지 精液의 液狀保存을 爲한 諸保存液이
精子 生存率에 미치는 影響

濟州大學校 大學院

畜産學科



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

文 奉 璿

1997年 6月

돼지 精液의 液狀保存을 爲한 諸保存液이
精子 生存率에 미치는 影響

指導教授 金 重 桂

文 奉 璿

이 論文을 農學 碩士學位 論文으로 提出함.

1997年 6月



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

文奉璿의 農學 碩士學位 論文을 認准함.

심사위원장 김민수 (인)
위 원 김문철 (인)
위 원 송동채 (인)

濟州大學校 大學院

1997年 6月

Effects on Sperm Viability in Various
Extenders for Liquid Storage
of Boar Semen

Bong-Chun Moon

(Supervised by Professor Jung-Kye Kim)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF AGRICULTURE



DEPARTMENT OF ANIMAL SCIENCE
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

1997. 6.

目 次

SUMMARY

I. 緒 論	1
II. 研究史	3
1. 精液의 保存溫度	3
가. 室溫保存	3
나. 低溫保存	4
2. 液狀精液의 稀釋液	4
III. 材料 및 方法	7
1. 試驗精液	7
2. 保存液別 造成表	7
3. 試驗方法	9
1) 保存液 選拔試驗	9
2) 保存溫度別 比較試驗	10
3) 保存期間別 比較試驗	10
4) 精子의 活力과 生存率試驗	10
5) 精子의 正常尖體形態 比較試驗	11
4. 保存液別 經濟性 比較分析	11
5. 統計分析	11
IV. 結果 및 考察	12
V. 摘 要	37
參考文獻	40

SUMMARY

This study was carried out to develop a superior, economic extender with high sperm motility index and normal apical ridge (NAR) in the storage of the liquid boar semen according to storage period and temperature.

The results are as follows.

1. Using the bull seminal extenders (IVT and modified IVT, CUE and modified CUE) as a boar seminal extender, at 17°C in 5 days' storage period, the sperm motility index was higher in mCUE than in the others. The storage period which showed that sperm motility index of over 70.0 at 17°C was 2 days to IVT and 3 days to mCUE. The sperm motility index at 5°C was higher in CUE than in the others. However, no extender was over 70.0 of the sperm motility index.
2. The sperm motility index compared, according to the seminal extender (tris A, B, C and D) which was diluted with trisaminomethane as buffer at 17°C, tris-D showed the highest sperm motility index. The seminal extender which showed the sperm motility index of over 70.0 according to the storage period was 2 days to tri-A, B and C, and 3 days to tris-D, respectively. At 5°C tris-A showed the highest sperm motility index, but no extender was over 70.0 of the sperm motility index.
3. The highest sperm motility index among Pursel, Beltsville L2 (BL2) and Modena at 17°C was in Pursel. The period which showed the sperm motility index of over 70.0 was 3 days to Pursel and Modena, and 2 days to BL-2.

The sperm motility index at 5°C in 5 days' storage period was the highest in Modena, but no difference was shown among treatments.

4. When 1.0% of bovine serum albumin (BSA), Ham's F10 and TCM199 were added to Pursel and imported extender, BSA treatment showed the highest sperm motility index in 7 days' storage period. The storage period which showed the sperm motility index of over 70.0 were 3 days under control (Pursel), 4 days to BSA and Ham's F10, 5 days to TCM199 and 3 days to imported extender.

5. In the treatment of additive, 0.6% of BSA and 0.3% of TCM199 showed the highest sperm motility index, while 1.2% of BSA and TCM199 showed the lowest. However, there was no difference among treatments.

6. NAR, according to the additive of BSA and TCM199 to Pursel, was higher in 0.6% of BSA and 0.3% of TCM199, and lower in 1.2% of BSA and 0.6% of TCM199 than the others. However, there was no difference among treatments.



7. Preparing for 1,000ml of extender, the cost was not only cheaper in TCM199, but the sperm motility index also was higher in TCM199 than in imported extender. Therefore, it is presumed that liquid Pursel with 0.6% of TCM199 is the best seminal extender for the storage of the boar semen.

I. 緒論

人工授精은 우수한 種牝畜에서 採取한 精液을 種牝畜에 移植하는 技術으로써 우수한 種牝畜의 利用範圍를 확대시킬 수 있고, 이로 인한 家畜改良이 促進 및 種牝畜의 遺傳的인 能力을 早期에 判定할수 있는 등 여러 가지 長點을 지니고 있는 技術이다. 이러한 技術은 1780년 Spallanzani가 강아지를 分娩시킨데서 최초로 이루어 졌으며, 또한 稀釋된 精液으로 人工授精이 可能하다는 것을 立證하였다.

돼지 人工授精에 관한 研究는 1930년경에 시작되어 다른 家畜들보다 歷史가 짧은 데, 그 중 가장 중요한 要因 중의 하나는 돼지 精子的 保存期間이 짧아 長期間 保存時 精子的 受精能力을 効果적으로 유지시킬 수 있는 방법이 결여되었기 때문이다(Pursel 등, 1973 ; Esteine 등, 1989).

人工授精에 있어서 精液의 保存方法에는 凍結保存法과 液狀保存法이 이용되고 있으며, 소의 人工授精에 있어서는 凍結精液이 이용되고 있지만, 돼지에 있어서는 低溫에 대한 抵抗性이 약하여(Polge, 1956) 低溫衝擊을 받게되면 生存率과 活力이 현저히 떨어지고, 凍結 融解後 精자의 頭帽 異常比率이 높으며, 1회 受胎에 필요한 精液量이 많고, 受胎率이 낮아지는 등 여러가지 制限的인 要因때문에 凍結精液의 이용은 實用化가 되지 못하고 있다(Pursel 등, 1972 : Pursel 등, 1973 ; 橋爪 등, 1976 ; Potter 등, 1979). 그러나 冷凍精液을 子宮頰官內 人工授精하여 최초로 성공시킨 결과가 Crabo와 Einarsson (1971), Graham 등 (1978) 및 Johnson 등(1979, 1980)의 報告들이 있다. 國內에서는 도입한 冷凍精液을 이용하여 人工授精한 결과가 尙 등(1984), 鄭 등(1987, 1989), 金 등(1992)에 의해 發表되었고, 液體窒素 콘테이너를 이용한 5ml 스트로의 凍結精液 製造方法이 金 등(1989)에 의하여 報告되었다. 그리고 돼지 液狀精液의 이용도 一般化되지 못하고 있는데, 이것은 液狀精液의 保存方法이 複雜하고 保存期間도 짧은데 있다. 따라서 돼지 液狀精液의 이용은 採取한 후 적절한 稀釋劑를 添加하여 當日 이용하거나 5~23℃에서 保存하여 이용하고 있다(Johnson 등, 1980).

精자를 保存하는데에는 여러 가지 緩衝液이나 卵拘液과 脫脂粉乳液을 비롯하여 여러 가지 保存液이 製造 및 開發되어 사용하고 있으나(Aamdal 등, 1957 ; du Mesnil du Buisson & Dauzier, 1958 ; Plishko, 1966 ; Pursel 등, 1973 ; Gottari 등, 1980), 이러한 保存液으로 稀釋한 液狀精液들은 3日정도 保存하여 使用 可能하고, 3日 以後에는 分娩率이나 産仔數가 減少하여 問題點이 있는 것으로 나타났다(鄭 등, 1989). 그리고 保存液의 造成에도 커다란 差異가 있는데, 이러한 保存液 種類別 造成의 差異는 精자의 生存에 필요한 要因들이 家畜別로 서로 相異하고, 또한 精자의 代謝에 있어서도 특이한 性質을 가지고 있기 때문이다(Sorensen, 1979 ; Hafez, 1980 ; Ahmed 등, 1984 ; Salem 등, 1992). 따라서 돼지 精液에는 水素이온濃度(pH)가 약알카리성이라는 점과 果糖含量이 약 9 ~ 48mg/100ml로 다른 家畜에 비하여 월등히 낮아 假死狀態를 일으키기 때문에 이런 점을 考慮하여 稀釋液이 製造되고 있다.

養豚産業의 大規模化, 企業化 및 輸入開放化 時代를 맞이하여 遺傳적으로 우수한 種牡豚의 活用度を 높이기 위해서는 冷凍精液은 물론 液狀精液을 이용한 人工授精의 필요성이 增加하고 있는 實情이다. 또한, 保存液은 精자의 運動성이 양호하며 低溫衝擊에 대한 抵抗성이 높고, 人工授精에 사용하여 受胎率이 높아야 할 것이다.

本 研究의 目的은 돼지 精液을 液狀狀態로 保存함에 있어서 이미 開發된 保存液을 중심으로 精자의 生存指數에 대한 豫備試驗을 실시하여 우수한 保存液을 選拔하고, 選拔된 保存液에 대하여 여러 가지 添加劑를 사용하여 添加水準別 精자의 生存指數 및 尖體의 形態가 우수하고, 또한 經濟的인 保存液을 開發할 目的으로 遂行하였다.

II. 研究史

遺傳能力이 우수한 種牡畜이 人工授精을 통하여 廣範圍하게 이용되기 위해서는 採取된 精液의 精子는 최대한의 受精能力을 保有한 狀態에서 長期間 保存되어야 한다.

돼지에 있어서 精液을 液狀狀態로 保存하는 方法으로서는 대부분 精液을 冷藏庫에 保存하였다가 使用하고 있다.

1. 精液의 保存溫度

돼지 精液의 液狀保存方法은 세가지 形態로 이용되고 있다. 첫째, 精液을 分離採取하지 않은 狀態에서 全精液을 保存하는 方法, 둘째, 分離採取하여 濃厚精液만을 取하여 稀釋保存하는 方法, 셋째, 精漿을 제거하여 保存하는 方法 등이 있다. 그리고 保存方法에 따라서 保存溫度도 다르게 나타나고 있다.

가. 室溫保存

全精液을 保存할 때에는 室溫(15~20℃)에서 保存하는 것이 精子生存성이 보다 우수하며, 採取直後 原精液을 20℃에 保存하였을 때 精子의 活力과 生存時間을 보면 採取直後 94+++였던 精子의 活力이 保存時間의 경과에 따라 점점 떨어져, +++의 精子運動성을 나타내는 時間은 약 48時間이고, 약 120時間 後에는 精子의 運動성이 停止된다. 精子의 生存率은 70% 以上の 生存時間은 採取後 약 45時間, 50%까지는 약 70時間, 120時間 경과하면 모두 죽게되어 人工授精에 이용가능한 精子 生存성과 運動성(70+++以上)을 나타내는 時間은 40~50時間 정도에 불과하다는 것을 알 수가 있다(丹羽 등, 1970).

全精液의 保存溫度와 精子 生存時間 및 精子의 活力과의 관계를 보면, 精子가 70%以上の 生存하는 時間은 15℃와 20℃에서 가장 길고, 運動성은 低溫에서는 不良하고 격렬한 運動性(+++)을 보여주는 時間은 10℃, 15℃, 20℃에서가 길다 (伊藤 등, 1948). 따라서 精자의 生存指數가 70+++ 以上の 活力을 나타내는 最適溫度는 15~20℃이며, 이러한 溫度에서 技術的으로 保存되면 2~3日間은 70+++ 以上の 精子生存성과 運動성을 유지할 수 있다(李, 1991).

나. 低溫保存

精液採取時 濃厚精液만을 分離採取하여 稀釋保存할 경우와 採取한 精液에서 精漿을 제거한 精液을 稀釋保存할 때의 最適 保存溫度는 全精液을 保存할 경우와 다르다. 分離採取된 精液의 경우 15℃以上の 保存溫度에서는 오히려 精子의 生存時間과 運動性 保有時間이 현저히 低下되고, 3~10℃에서는 保存성이 良好하였다(伊藤 등, 1948). 이것은 精子濃도가 높은 소와 양의 精液을 10℃ 以下에서 保存한 결과와 비슷하며, 돼지 精液도 分離採取하여 濃厚精液만을 稀釋保存할 경우 소 精液과 같이 保存이 可能함을 보여준다. 따라서 돼지 精液의 分離採取는 精液을 效率的으로 保存하는데 있어서 有益한 方法임을 알 수가 있다.

採取한 精液을 遠心分離하여 精漿을 제거한 다음에 稀釋液을 加하여 稀釋 保存할 경우에도 15~17℃에서보다 6~8℃에서가 精子의 生存성이 우수하였다(金 등, 1976). 따라서 돼지 精液의 液狀保存時 短期間의 保存을 위해서는 室溫保存도 可能하겠지만, 低溫(4~5℃, 冷藏庫)에 넣어서 保存하는 方法이 더욱 保存성을 延長시킬 수가 있다(李, 1991).

2. 液狀精液의 稀釋液

돼지 精液을 稀釋 保存할 경우에는 소에서와는 달리 果糖의 含量의 낮고, 水

素이온濃度(pH)가 약알칼리성이라는 점을 考慮하여 製造하여야 한다(李, 1991).

稀釋液은 주로 에너지源, 保護較質, 電解質, 非電解質, 抗生物質 또는 특수한 添加物質로 構成되어 있으며, 精子的 에너지源으로서는 葡萄糖(glucose)과 같은 糖類를, 低溫衝擊(cold shock)이나 鹽類의 害로부터 精子를 保護하기 위하여 卵黃(egg yolk)과 牛乳(milk)를 이용하고 있다. 또한 精漿과 類似한 水素이온濃度(pH)를 유지하기 위하여 緩衝劑(buffer)로 구연산(citric acid), 磷酸(phosphate), triaminomethane 등이 사용되며, 滲透壓을 유지하기 위하여 陽이온과 陰이온을 稀釋液에 添加한다. 細菌繁殖 抑制 및 精子代謝 抑制를 하기 위해서는 抗生物質(sulfanilamide, penicillin, streptomycin 등)을 添加하며, 精液을 常溫에 保存하고자 할 때에는 CO₂와 같은 精子的 代謝 抑制劑를 添加하기도 한다(Van Demark 등, 1957).

卵拘液은 理想的인 稀釋液으로 開發되었는데 溫度 및 水素이온濃度(pH)의 變化에 대한 緩衝作用, 營養物質의 普及, 高度의 稀釋과 長期保存의 可能하기 때문이라고 하였다(Salisbury, 1941). 卵黃을 主成分으로하는 稀釋液 種類 중 Phillips(1939)는 新鮮한 鷄卵의 卵黃과 磷酸 緩衝液으로 調製한 稀釋液이 소 精子的 生存 및 受精能力 維持에 상당한 效果가 있다고 한 後 Phillips와 Lardy(1940)는 이 卵黃 緩衝液으로 소 精液을 稀釋하여 180時間 保存한 精液으로 受胎하였다고 報告하였다. 또한 Salisbury 등(1941)이 卵黃구연산緩衝糖液(卵拘糖液)에 5~6%의 葡萄糖液을 添加하여 開發한 稀釋液을 이용하여 精液과 稀釋液을 1:1의 比率로 稀釋한 後 15℃에 保存할 경우 70+++以上の 精子 生存率을 5~7日間 維持시킬 수가 있었다고 하였으며(丹羽 등, 1955), Polge(1956)는 原精液을 이 稀釋液으로 2倍 稀釋 後 5℃에 保存할 경우 60~70+++의 生存率을 5~6日間 保存할 수가 있었다고 報告하였다. 그 後 여러 研究者들에 의하여 卵黃 이외의 造成에 대하여 改善을하여 구연산나트륨 대신에 트리스아미노메탄(trisaminomethane)을 사용하였고, 各種 糖類, 아미노산 및 특수한 藥劑가 添加되는 등 많은 改良을 하였다. 卵黃 트리스液은 緩衝劑로서 트리스와 구연산을 사용한 것이 特徵으로, Davis 등(1963)은 이 稀釋液을 이용하여 5℃에서 8日間 保存한 결과 卵黃구연산液보다 현저히 좋았다고 하였고, 畜産試驗場에서 調製한

卵黃트리스液으로 韓牛 精液을 稀釋하여 5℃에 保存한 경우 保存 4日의 精子的 生存指數는 60.1이었다고 報告하였다(任 등, 1979).

牛乳를 主成分으로 한 粉乳糖液은 丹羽 등(1960)이 10%의 澱粉乳液 또는 8%의 脫脂粉乳液에 葡萄糖을 添加하여 製造한 稀釋液으로 이 稀釋液을 이용하여 精液을 4倍 稀釋 後 15℃에서 1~3日間 保存하여 人工授精시킨 결과 60~70%의 受胎率을 얻었다고 發表하였고, 任(1962)도 脫脂粉乳 6.0g, 葡萄糖 1.5g, 설과닐아미드(sulfanilamide) 0.3g에 滅菌蒸溜水를 加하여 100ml이 되게 調製한 脫脂粉乳液으로 稀釋 後 5~10℃에서 保存하여 좋은 결과를 얻었다고 하였다.

和出 등(1977)은 돼지 精液을 7~8℃에 保存할 目的으로 開發한 M-4液으로, 曹谷과 河部(1977)는 트리스 緩衝粉乳糖液으로 4~5℃에 保存할 경우 1週日 정도 保存이 可能하고 受胎率도 비교적 높다고 하였다. 또한 M-4液을 改善한 MC-14液으로 4倍 稀釋하여 6~7℃에 保存한 결과 120時間 保存 後에도 0~48時間 保存한 精液과 같은 정도의 受胎率을 얻었다고 報告하였다(和出 등, 1977).

最近에 金 등(1995)은 돼지 液狀精液의 長期保存이 繁殖能力에 미치는 影響調查에서 保存期間別 精子的 活力과 正常尖體比率은 常溫精液과 冷蔵精液 사이에는 커다란 差異가 發見되지 않았다고 報告하였다. 그리고 5ml 스트로에 保存한 여러 가지 돼지 液狀精液의 生存性과 受精能力에 관한 研究에서 BF5 稀釋液은 돼지 精子를 9日間 保存시키면서 受精能力을 維持시켜 주었고, 5℃에 9日 保存된 스트로 液狀精液의 受胎率과 分娩率은 各各 70%와 50%라고 報告하였다(鄭 등, 1989). 그리고 Lactose-egg-yolk와 Butschwiler 稀釋液으로 돼지 精液을 稀釋하여 5℃와 15℃에 保存하여 精子的 運動性과 正常尖體比率을 試驗하여 본 결과, 5℃에서는 Lactose-egg-yolk 稀釋液이 Butschwiler 稀釋液보다 有意하게 높았고($p < 0.05$), 15℃에서는 Butschwiler 稀釋液이 Lactose-egg-yolk 稀釋液보다 有意하게 높게 나타났으며, 精液의 glycerol 濃度效果는 2.0%일 때 가장 높은 精子 運動性과 正常尖體比率을 나타내었다고 報告하였다(Park 등, 1996).

Ⅲ. 材料 및 方法

1. 試驗精液

實驗에 使用된 精液은 1996年 3月, 5月, 8月, 10월에 걸쳐 月 1회씩 道內 養豚 團地內에서 飼育되고 있는 숫돼지(Landrace와 Yorkshire)를 대상으로 無作為로 選拔 採取하였다. 精液採取는 人工婬을 이용하는 것보다 간단하고 經濟的이며 精液採取 器具의 洗滌과 滅菌에 용이한 水壓法으로 採取하였다. 採取된 精液은 즉시 200倍의 顯微鏡下에서 精子의 運動性을 觀察한 後 80+++ 以上인 精液 1ml 과 等溫으로 加溫된 保存液 1ml을 이용하여 1次로 保存液과 精液을 1:1의 比率로 稀釋하고, 2次로 2~3ml의 保存液을 添加하여 最終적으로 3~4倍 稀釋하여 試驗管에 넣어 封印하였다. 封印된 精液은 精液 保存箱子(Boar Semen, Medsem, England)에 넣어서 實驗室로 運搬하여 試驗에 使用하였다.

2. 保存液別 造成表



國內外에서 使用되고 있는 保存液 16種을 對象으로 豫備試驗을 통하여 精子의 生存指數가 우수한 保存液 11種을 選拔하였으며, 그 主成分은 Table 1-1, 1-2, 1-3에 나타낸 바와 같다. 이 造成成分을 3次 蒸溜水 1,000ml에 溶解하여 水素이온濃度(pH)를 1.0N NaOH와 1.0N HCl을 이용하여 7.3~7.4로 調整하여 10 ml 용량의 screw cap tube에 5ml씩 넣어 냉장고에 보관하면서 使用하였다.

Table 1-1. Composition of seminal extenders

Component	IVT	mIVT	CUE	mCUE
Sodium citrate(g)	2.00	0.60	1.45	0.70
Sodium bicarbonate(g)	0.21	0.125	0.21	0.15
Potassium chloride(g)	0.04	0.075	0.04	0.025
Glucose(g)	0.30	3.00	3.00	3.00
Skim milk(g)	10.00	6.00	10.00	10.00
Glycine(g)	-	-	0.937	0.937
Streptomycin(g)	0.006	0.006	0.006	0.006
Penicillin G(g)	0.006	0.006	0.006	0.006

Table 1-2. Composition of seminal extenders

Component	Tris-A	Tris-B	Tris-C	Tris-D
Sodium bicarbonate(g)	-	0.13	-	-
EDTA(g)	0.125	-	-	-
Glucose(g)	2.0	2.50	2.70	2.50
Tris(g)	1.075	0.14	0.20	0.20
Citric acid(g)	0.533	0.13	0.13	1.10
Skim milk(g)	5.00	2.00	4.32	-
Glycine(g)	0.47	-	-	-
Fructose(g)	1.00	0.15	-	-
Catalase(g)	0.02	-	-	-
Inocitol(g)	0.15	0.15	-	-
Glycerine(ml)	1.0	-	-	-
Ethylen glycol(ml)	1.0	-	-	-
Sodium phosphate(g)	-	0.02	-	-
Caffeine(g)	-	0.006	-	-
Streptomycin(g)	0.006	0.006	0.006	0.10
Penicillin G(g)	0.006	0.006	0.006	0.06

Table 1-3. Composition of seminal extenders

Component	Pursel	BL-2	Modena
Sodium citrate(g)	0.60	-	0.69
Sodium bicarbonate(g)	0.125	-	0.10
EDTA(g)	0.125	-	0.225
Potassium chloride(g)	0.075	-	-
Glucose(g)	3.70	2.50	2.51
Tris(g)	-	0.20	0.565
Citric acid(g)	-	1.10	0.20
Streptomycin(g)	0.006	0.10	0.006
Penicillin G(g)	0.006	0.06	0.006
Cystein(g)	-	-	0.05
B. S. A. (g)	-	-	0.30

3. 試驗方法

1) 保存液 選拔試驗



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

保存液들을 Table 1-1, 1-2, 1-3의 造成表에 따라 調製한 후 保存溫度(17℃와 5℃) 및 保存期間別(1, 2, 3, 4 및 5日)로 精子의 生存指數를 比較試驗하여 우수한 保存液를 選拔하였다. 選拔된 保存液은 bovine serum albumin(BSA, Sigma) 과 卵子的 保存劑로 이용되고 있는 Ham's F10(Sigma) 및 TCM199(Difco)을 添加하여 添加水準別(0.3, 0.6, 1.2%)로 精子의 生存指數와 尖體形態(NAR)를 比較試驗하여 最適 濃度水準을 결정하였으며, 또한 道內에서 사용되고 있는 輸入 保存液과 比較試驗하였다.

2) 保存溫度別 比較試驗

精液採取 後 保存液別로 稀釋된 精液을 17℃의 精液保存箱子(boar semen incubator, Medsem, England)와 5℃의 冷藏庫에 保存하면서 保存期間別로 精子的 生存指數 및 正常頭帽 尖體形態(normal apical ridge, NAR)를 試驗하였다. 5℃에 保存時에는 溫度的 급격한 下落으로 精자가 低溫衝擊을 받게되는 것을 防止하기 위하여 17℃에 保存된 稀釋精液을 적당량의 물(20℃ 內外)이 들어있는 비이커에 넣고서 冷藏庫에 保存하면서 試驗에 使用하였다.

3) 保存期間別 比較試驗

精液採取 直後の 精자의 生存指數를 試驗한 것을 保存 1日로 記錄하여 保存 5日까지 保存液別 및 保存溫度別로 精자의 生存指數를 比較試驗하였으며, 最終 選拔된 保存液들에 대해서는 保存期間을 7日까지 延長하여 比較試驗하였다.

4) 精자의 活力과 生存率試驗

稀釋液別 및 保存溫度別로 5日間 保存하면서 每 24時間마다 保存된 精液을 各各 100 μ l씩 採取하여 microtube에 넣은 후 37℃에서 10分間 培養하였다. 培養된 精液은 미리 加溫시킨 slide glass위에 1방울(10 μ l 內外) 適下하여 cover glass로 덮고 200~400 \times 의 光學顯微鏡下에서 精자의 活力과 生存率을 試驗하였으며, 每 檢査時 3回 反復 檢査하여 生存率의 平均値를 記錄하였다.

試驗結果의 表記는 精자의 活力과 生存率을 동시에 나타낼 수 있는 評價方法으로서 運動의 정도에 따라 5段階(+++, ++, +, \pm , -)로 區分하여 精자의 生存指數를 記錄하였다. 生存指數의 算出은 精자의 活力을 나타내는 符號에 대하여 一定한 計數를 附與(+++ : 100, ++ : 75, + : 50, \pm : 25, - : 0)하고 各 符號에 해당하는 生存率과 計數를 곱한 數値를 合하여 100으로 나누어 精液의 精子 生存指數를 나타내었다(西川, 1951).

5) 精子的 正常 尖體形態 比較試驗

精子的 正常尖體形態(正常 頭帽, Normal apical ridge)는 Diff-Quick 染色方法 (Kruger 등, 1987)을 이용하였다. 稀釋 保存된 精液을 slide glass위에 1방울(10 μ l 內外) 適下하여 얇게 塗抹하고 自然 乾燥시킨 後 Diff-Quick fixative로 15초 동안 固定하고, 그다음 溶液 1(1mg Xamthene을 Sodium Azide 100ml에 溶解)에서 10초 동안 slide를 染色시킨 後 溶液 2(0.625mg azure A와 0.625mg Methylene blue을 buffer 100ml에 溶解)에서 5초 동안 染色하여 自然 乾燥하여 immersion oil을 1방울 適下하고 位相差 顯微鏡下에서 1,000 \times 의 倍率로 正常尖體(NAR)比率을 調査하였다.

4. 保存液別 經濟性 比較

精子的 生存指數 가장 우수하고, 또한 經濟的인 保存液을 開發하기 위하여 本試驗에서 사용된 保存液에 대하여 製造하였을 경우의 價格과 現在 道內에서 輸入하여 사용되고 있는 保存液과의 價格을 比較하였다.

價格基準은 달러(\$)를 元貨로 換算하였으며, 價格算出은 1달러(\$)를 元貨 1,000으로 換算하였다.

5. 統計分析

實驗資料의 分析은 PC-SAS package를 이용하였으며, 各 處理에 대하여 保存液別, 保存溫度 및 保存期間別로 精子的 生存指數와 正常頭帽率의 平均과 標準誤差를 구하였으며, 分散分析으로 處理하여 各各의 處理에 대하여 保存日別로 有意差를 認定 檢定하였다.

IV. 結果 및 考察

1. IVT, CUE, 變形시킨 mIVT 및 mCUE 保存液의 精子 生存指數

소의 液狀精液 保存用으로 사용되고 있는 IVT(Illinoise variable temperature) 와 CUE(Cornelli university extender) 保存液 및 이 保存液을 變形시킨 mIVT 와 mCUE 保存液을 돼지 精液에 사용하여 保存溫度別 精子의 生存指數를 試驗 했던 바 Table 2 및 Figure 1과 같은 成績을 얻었다.

保存液別 保存溫度 17℃에서 保存期間 1, 2, 3, 4, 5日까지 精子의 生存指數를 比較할 때 IVT 保存液이 各各 90.2, 67.5, 57.5, 48.5, 30.6으로 平均 精子의 生存指數는 58.9로 나타났고, mIVT 保存液에서는 90.2, 73.1, 61.2, 50.0, 30.6으로 平均 61.0이었다. 그리고 CUE 保存液에서는 各各 90.2, 68.8, 56.3, 47.8, 31.2로 平均 58.9였고, mCUE 保存液에서는 90.2, 80.6, 75.6, 66.2, 51.3으로 平均 72.8로 나타나 mCUE 保存液이 양호하였고, CUE 保存液이 低調하게 나타났으나 保存液別로는 有意差가 認定되지 않았다. 그리고 精子의 生存指數가 70.0 以上을 보인 保存液은 mIVT 保存液에서 2日, mCUE 保存液에서 3日로 變形시킨 保存液의 精子 生存指數가 우수하게 나타났다.

保存溫度 5℃에서 保存 5日間 精子의 生存指數는 IVT 保存液이 各各 90.2, 48.5, 35.0, 27.5, 12.2로 平均 精子의 生存指數는 42.7이었고, mIVT 保存液에서는 90.2, 47.8, 33.8, 21.6, 13.5로 平均 41.4를 보였다. 그리고 CUE 保存液에서는 90.2, 50.6, 34.1, 26.0, 16.9로 平均 43.6이었고, mCUE 保存液에서는 90.2, 57.5, 43.1, 26.0, 15.7로 平均 46.5를 보임으로써 保存 5日까지의 平均 精子의 生存指數는 mCUE 保存液이 良好하였고, mIVT 保存液이 低調하게 나타났으나 保存液別로는 有意差가 認定되지 않았다. 그리고 精子의 生存指數가 70.0 以上을 나타낸 保存液은 保存 1日을 除外하고는 없었다. 이와같이 同一한 保存溫度에서의 保存液別 有意差가 認定되지 않은 것은 豫備試驗을 통하여 精子의 生存指數가

우수하다고 立證된 保存液들을 選拔하여 比較試驗하였기 때문이라고 생각된다. 그러나 保存溫度別 平均 精子의 生存指數는 17℃가 5℃보다 높게 나타나 有意差가 認定되었으며($p < 0.001$), 또한 保存溫度別로 保存期間이 경과할 수록 精子의 生存指數는 급격히 下落하였다($p < 0.001$).

上記의 結果에서 보는 바와 같이 精子의 生存指數는 保存溫度 17℃가 우수하게 나타났으며, 5℃에 保存할 경우에는 精子의 運動性이 급격히 下落하는 傾向을 나타냈는 데, 이렇게 精子의 運動性이 낮은 것은 갑자기 射出精液의 溫度를 0~15℃로 내릴 경우 低溫衝擊으로 인하여 精子의 運動性이 낮아진다는 報告와 一致하고 있다(Blackshaw, 1954 ; Blackshaw 등, 1957 ; Mann 등, 1955 ; Mayer, 1955 ; Pursel 등, 1972). 그리고 돼지 精液을 稀釋하여 5℃에 保存할 때에는 많은 溫度衝擊을 가져옴으로 5℃의 低溫衝擊은 피하여야 하고, 또한 5℃로 冷却할 때에는 서서히 해야 한다고 報告하였으며(任 등, 1979), 康 등(1982)은 家畜 精子의 運動能力에 미치는 要因으로서는 溫度, 빛, 酸素, 炭酸가스, 水素이온濃度(pH), 여러 가지 이온, 滲透壓과 各種 호르몬 등이라고 하였다. 따라서 本試驗에서 17℃가 5℃보다 良好한 것은 溫度衝擊 및 精液의 稀釋倍率이 높은 것으로 思料된다.

Ool(1976)은 돼지 精液을 IVT 保存液으로 稀釋하여 保存하였을 경우에 前進 精子比率은 採取 1日에 59%, 2日에 44%, 3日에 45%였다고 報告하였으며, 그리고 돼지의 濃厚精液을 IVT 保存液 및 BL-1 保存液으로 稀釋하여 15℃에서 5日間 保存하였을 때 保存 4日에서 運動精子의 比率이 BL-1 保存液보다 IVT 保存液이 더 빨리 減少하였다고 發表하여(Baritau 등, 1977) 本試驗에서와 비슷한 것이었으나 IVT와 CUE의 室溫保存液은 돼지 精液용으로 變形시켰을 때 보다 좋은 成績을 보여주었다.

그리고 金 등(1976)은 各種 稀釋液이 돼지 精液 保存성에 미치는 影響을 調査한 바 畜産技術研究所에서 開發한 稀釋液을 이용하여 돼지 精液을 稀釋하여 5日間 保存하였을 경우 精子의 生存率은 各各 72%, 63%, 58%, 53%, 17%, 0%였으며, 稀釋한 精液의 保存溫度는 15℃가 적합하다고 하였고, T₂₂ 保存液으로 稀釋한 돼지 精液을 5日間 保存時 精子의 生存率은 各各 73%, 70%, 65%, 63%,

60%, 53%로 平均 64.0% 였으며, EDTA 添加水準은 0.1~0.2%가 精子의 保存性이 현저히 向上되었고, 稀釋된 精液의 保存溫度는 8~15℃가 적합하다고 報告하였는데 本 成績과 比較하였을 때 낮은 結果를 보여주었다. Johnson 등(1980)은 18℃에서 돼지 精液을 3日동안 保存하였을 때 液狀精液의 稀釋液으로서는 BL-1 稀釋液보다는 Kiev 稀釋液이 더 적합하다고 하였다. Aalbers 등(1983)은 Beltsville, Kiev, Zorlesco, Modena 등 4種類의 稀釋液으로 精液을 稀釋하여 18℃에서 3日間 保存한 結果 精子의 運動性은 Kiev 稀釋液이 26%로 가장 낮았고, Zorlesco 稀釋液으로 稀釋한 精液이 56%로 가장 우수하였다고 報告하였으나 本 試驗 成績보다는 낮았다. Blichfeldt 등(1988)은 Kiev와 BTS 稀釋液으로 稀釋한 精液에 대한 受精能力 比較試驗에서 精液採取 後 1日과 2日에서는 有意差가 나타나지 않았으나 採取 3日째에는 BTS 稀釋液으로 稀釋한 精液이 우수하다고 發表하였고, Cervosky 등(1986)은 Modena, BTS, Kiev, NG 稀釋液으로 稀釋한 精液을 利用하여 精子의 生存率을 比較試驗한 結果 NG 稀釋液이 다른 稀釋液들에 비하여 有意差가 있다고 報告하였다. 또한 IVT, citrate, triaminomethane 으로 稀釋한 精液에 여러 가지 EDTA 添加水準을 比較한 試驗에서 EDTA 最適濃度는 1~1.25g/ml이라고 하였으며(Senegcnik, 1968), Willeke 등(1989)은 EDTA, 變形시킨 EDTA, BTS, BW1 稀釋液으로 稀釋한 精液을 利用하여 實驗한 結果 稀釋液別로 精子의 運動性에는 有意差가 나타났다고 報告하였다.

Table 2. Sperm motility index* of liquid boar semen diluted with IVT, mIVT, CUE and mCUE extenders at storage period and storage temperature of 17°C and 5°C.

Ext. temp.	Storage	Storage period of liquid semen (day)				
		1	2	3	4	5
IVT	17°C	90.2±1.25 ^a	67.5±8.90 ^{abc}	57.5±8.42 ^{bc}	48.5±10.01 ^a	30.6±9.09 ^b
	5°C	90.2±1.25 ^a	48.5±7.85 ^c	35.0±5.20 ^d	27.5± 6.12 ^b	12.2±1.18 ^b
mIVT	17°C	90.2±1.25 ^a	73.1±5.04 ^{ab}	61.2±6.81 ^{ab}	50.0± 5.95 ^{ab}	30.6±7.32 ^b
	5°C	90.2±1.25 ^a	47.8±7.90 ^c	33.8±4.84 ^d	21.6± 4.31 ^b	13.5±4.68 ^b
CUE	17°C	90.2±1.25 ^a	68.8±7.74 ^{abc}	56.3±6.57 ^{bc}	47.8± 8.59 ^a	31.2±8.98 ^b
	5°C	90.2±1.25 ^a	50.6±4.24 ^c	34.1±2.36 ^d	26.0± 2.56 ^b	16.9±3.87 ^b
mCUE	17°C	90.2±1.25 ^a	80.6±2.77 ^a	75.6±1.88 ^a	66.2± 3.15 ^a	51.3±8.20 ^a
	5°C	90.2±1.25 ^a	57.5±4.45 ^{bc}	43.1±4.72 ^{dc}	26.0± 4.94 ^b	15.7±4.07 ^b

* Values are mean ± S.E. for 4 replicates.

** Values were high significance between of 17°C and 5°C (p<0.001)

*** Values were high significance with the passage of storage period (p<0.001)

a,b,c,d : Values in the same column with differing superscripts differ significantly (p<0.01)

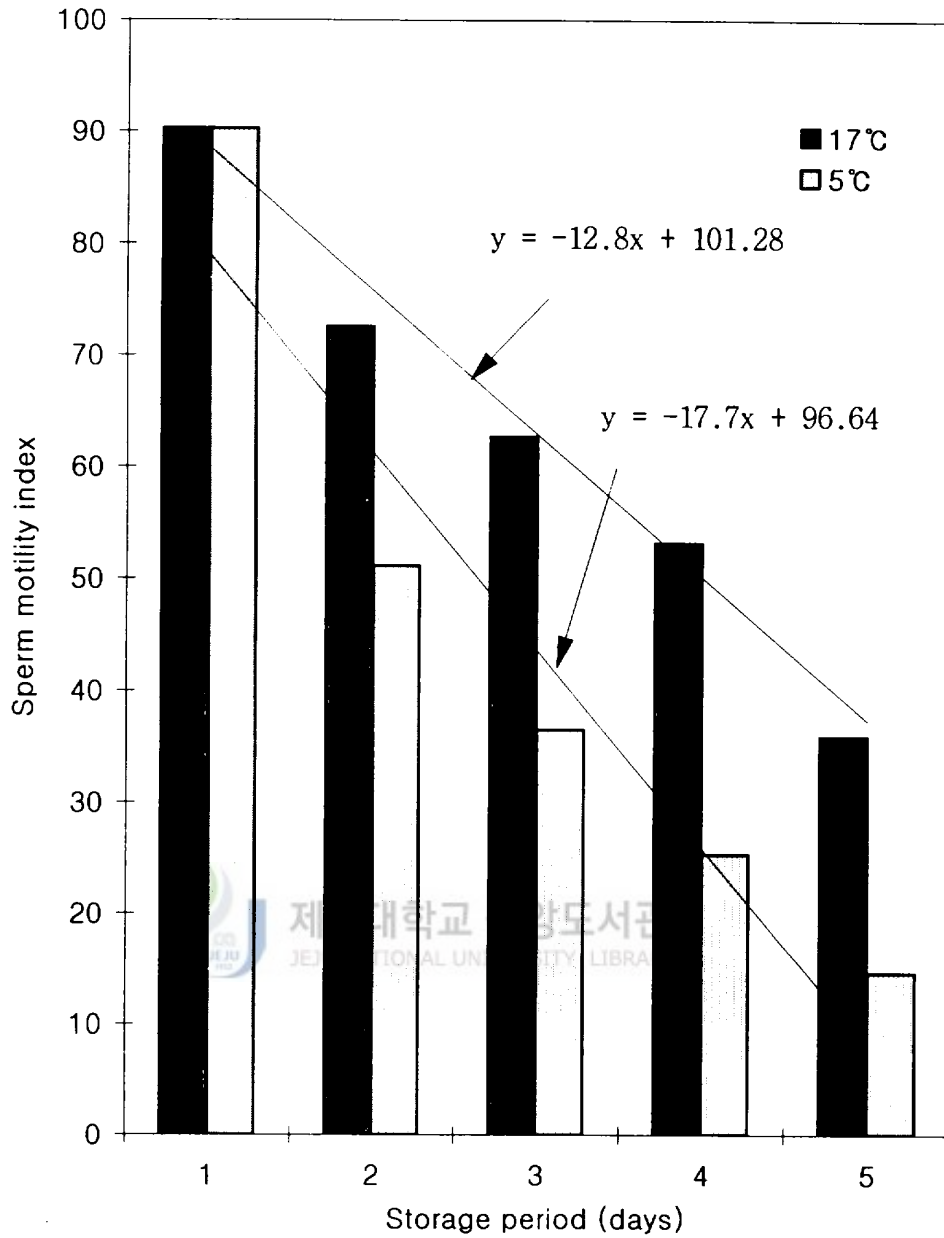


Fig. 1. Changes of sperm motility index of storage period and storage temperature in liquid boar semen diluted IVT, mIVT, CUE, and mCUE extenders.

2. Tris 緩衝液을 위주로 製造한 保存液의 精子 生存指數

Table 3 및 Figure 2에 나타낸 精子의 生存指數는 精漿과 유사한 水素이온濃度(pH)를 維持시키기 위하여 緩衝劑로 사용하고 있는 trisaminomethane을 爲主로 製造한 保存液을 이용하여 保存溫度別로 돼지 精液에 사용하여 保存期間別 調査한 成績이다.

保存溫度 17℃에서의 保存 5日까지 精子의 生存指數는 Tris-A 保存液이 各各 90.8, 83.3, 66.7, 55.8, 26.7로 平均 精子의 生存指數는 64.7이었고, Tris-B 保存液은 90.8, 84.2, 64.2, 52.5, 30.0으로 平均 64.3이었다. 그리고 Tris-C 保存液에서는 90.8, 82.5, 65.0, 43.3, 21.3으로 平均 60.6이었고, Tris-D 保存液에서는 90.8, 81.7, 70.8, 55.0, 40.4로 平均 67.7로 나타났다. 上記의 結果를 보면 保存 2日까지는 Tris-B 保存液의 精子 生存指數가, 保存 3日에는 Tris-D 保存液이 우수하였다. 그리고 保存 4日에는 Tris-A 保存液과 保存 5日에는 Tris-D 保存液이 우수하게 나타났으나 保存 5日까지의 平均 精子의 生存指數는 Tris-D 保存液이 良好하였고, Tris-C 保存液이 低調하였으나 保存液別로 有意差는 認定되지 않았다. 그리고 精子의 生存指數가 70.0 以上을 보인 保存液은 保存 2日까지는 全 保存液에서 나타났고, 保存 3日에는 Tris-D 保存液이 唯一하였다.

保存溫度 5℃에서의 保存期間別 精子의 生存指數는 Tris-A 保存液이 各各 90.8, 63.3, 43.3, 27.9, 17.5로 平均 精子의 生存指數는 48.6이었고, Tris-B 保存液은 90.8, 53.3, 35.8, 28.3, 15.8로 平均 44.8로 나타났다. 그리고 Tris-C 保存液은 90.8, 53.3, 33.3, 21.3, 16.3으로 平均 43.0이었고, Tris-D 保存液은 90.8, 57.5, 39.2, 27.5, 13.4로 平均 45.7로 나타나 保存 1日부터 3日까지 精子의 生存指數는 Tris-A 保存液이 우수하였고, 保存 4日에는 Tris-B 保存液이 우수하였으며, 保存 5日에는 다시 Tris-A 保存液이 우수하게 나타났다. 그리고 保存 5日까지의 平均 精子의 生存指數는 Tris-A 保存液이 良好하였으나 保存液別로 有意差는 認定되지 않았으며, 精子의 生存指數가 70.0 以上을 보인 保存液은 保存 1日 以後에는 없었다.

保存溫度別 平均 精子的 生存指數는 保存溫度 5℃보다는 17℃가 높게 나타나 保存溫度別 有意差가 認定되었으며($p < 0.001$), 保存溫度別 保存期間의 경과함에 따라 精子的 生存指數는 급격히 하락하였다($p < 0.001$).

King(1966)은 돼지 精液을 稀釋하여 5℃로 내릴 경우에는 冷却하는 時間과는 관계없이 精子는 活力을 25%를 喪失하며 冷却되는 동안에도 保存液은 精子를 충분히 保護하지 못한다고 하였다. 그리고 低溫衝擊에 대한 돼지 精子的 變化는 稀釋倍率이 높을수록 더 增加하고, 培養前에 1:6이나 1:10으로 稀釋한 精子가 1:2로 稀釋한 精子보다 더 變化가 높았으며, 培養前에 洗滌한 精子는 1時間 培養한 것보다는 5時間 培養한 것이 低溫衝擊에 대한 抵抗性이 높았고, casein을 2~4% 含有한 tris-lactose 稀釋液은 低溫衝擊에 대한 精子的 尖體는 豫防이 되었으나 精子的 運動性에 대한 低溫衝擊은 減少하지 않았다고 하였다.

또한 돼지 精子를 30℃의 in vitro 培養時에는 低溫衝擊에 대한 抵抗性이 向上되었고, 稀釋液의 水素이온濃度(pH)는 低溫衝擊에 대한 抵抗性에 현저한 效果를 가지고 있다고 하였으며, 精子를 2時間 培養한 後에 低溫衝擊을 주었을 때 精子的 運動性은 水素이온濃度가 5.9와 6.6보다는 7.3, 8.0, 8.3에서가 有意하게 높았다($p < 0.01$). 그러나 精子的 尖體는 7時間 培養한 後에 低溫衝擊에 대한 抵抗性이 水素이온濃度가 8.0, 8.3인 稀釋液보다 5.9, 6.6, 7.3인 稀釋液이 有意하게 높았으며($p < 0.01$), 5時間 培養한 後에 低溫衝擊에 대한 抵抗性은 glucose나 fructose를 含有한 稀釋液보다 lactose, sucrose, raffinose를 含有한 稀釋液에서가 有意하게 높았다($p < 0.01$). 本 試驗에서 Table로는 提示하지 않았지만 豫備試驗을 통하여 얻어진 結果와 比較하였을 때 稀釋液에 있어서 tris의 添加는 1~5 時間 培養에서 低溫衝擊에 대한 有意한 效果는 없었고, tris-lactose 稀釋液에 egg-yolk를 0~30%를 添加한 水準에서도 1~5時間 培養에서 有意差가 없었으며 egg-yolk 稀釋液에서 보다는 0% egg-yolk 稀釋液에 있어서 5時間 培養한 後에는 低溫衝擊에 대한 抵抗性이 더 높다는 報告와 一致하였음을 보여주었다 (Pursel 등, 1973).

任 등(1979)은 트리스 卵黃緩衝液과 脫脂粉乳液을 1:1의 比率(가 保存液)로, 脫脂粉乳液과 트리스 卵黃緩衝液(廣野 등, 1976)을 1:1의 比率(나 保存液)로 調

製한 것과 트리스 卵黃緩衝液(다 保存液, 廣野 등, 1976)을 이용하여 原精液을 1:1 혹은 1:2로 稀釋하여 5℃에서 7日間 保存時 精子的 生存指數는 稀釋倍率에 關係없이 나 保存液과 다 保存液이 가 保存液보다 높았다. 그리고 나 保存液과 다 保存液 사이에는 差異를 認定할 수가 없었으나 稀釋倍率에 있어서는 1:1 보다는 1:2의 稀釋倍率에 높았고, 精子的 生存指數가 70 以上을 보이는 保存期間은 가 保存液이 1:1의 比率로 稀釋時 2日, 1:2의 比率로 稀釋時는 3日이었으며, 나 保存液은 稀釋倍率에 關係없이 3日, 다 保存液은 1:1의 比率로 稀釋時 3日, 1:2로 稀釋時는 5日이었다. 또한 나 保存液에 DMSO를 添加할 경우에는 添加하지 않은 것보다 精子的 生存指數가 약간 높았다고 하였다. 그러나 本 試驗은 全精液을 採取하여 1:4로 稀釋하였기 때문에 精子的 生存指數가 낮은 것으로 생각되어 凍結 保存液을 위한 稀釋倍率은 낮아야 되며 分離採取 또는 遠心分離하여 稀釋濃度를 낮추어야 됨을 提示하여 주었다.



Table 3. Sperm motility index* of liquid boar semen diluted with trisaminomethane extenders at storage period and storage temperature of 17°C and 5°C.

Ext.	Storage temp.	Storage period of liquid semen (day)				
		1	2	3	4	5
Tris-A	17°C	90.8±1.67 ^a	83.3±4.17 ^a	66.7±6.51 ^a	55.8± 9.28 ^a	26.7± 2.20 ^{ab}
	5°C	90.8±1.67 ^a	63.3±3.00 ^b	43.3±3.00 ^b	27.9± 7.21 ^{bc}	17.5± 5.63 ^b
Tirs-B	17°C	90.8±1.67 ^a	84.2±3.33 ^a	64.2±3.33 ^a	52.5± 7.64 ^{ab}	30.0±10.10 ^{ab}
	5°C	90.8±1.67 ^a	53.3±3.00 ^c	35.8±5.07 ^b	28.3± 5.83 ^{bc}	15.8± 6.67 ^b
Tris-C	17°C	90.8±1.67 ^a	82.5±2.50 ^a	65.0±0.00 ^a	43.3±13.10 ^{abc}	21.3± 8.85 ^{ab}
	5°C	90.8±1.67 ^a	53.3±3.00 ^c	33.3±5.83 ^b	21.3± 6.87 ^c	16.3± 6.89 ^b
Tris-D	17°C	90.8±1.67 ^a	81.7±3.63 ^a	70.8±3.33 ^a	55.0± 5.77 ^a	40.4± 5.86 ^a
	5°C	90.8±1.67 ^a	57.5±0.00 ^{bc}	39.2±4.41 ^b	27.5± 0.00 ^{bc}	13.4± 2.07 ^b

* Values are mean ± S.E. for 4 replicates.

** Values were high significance between of 17°C and 5°C (p<0.001)

*** Values were high significance with the passage of storage period (p<0.001)

a,b,c : Values in the same column with differing superscripts differ significantly (p<0.01)

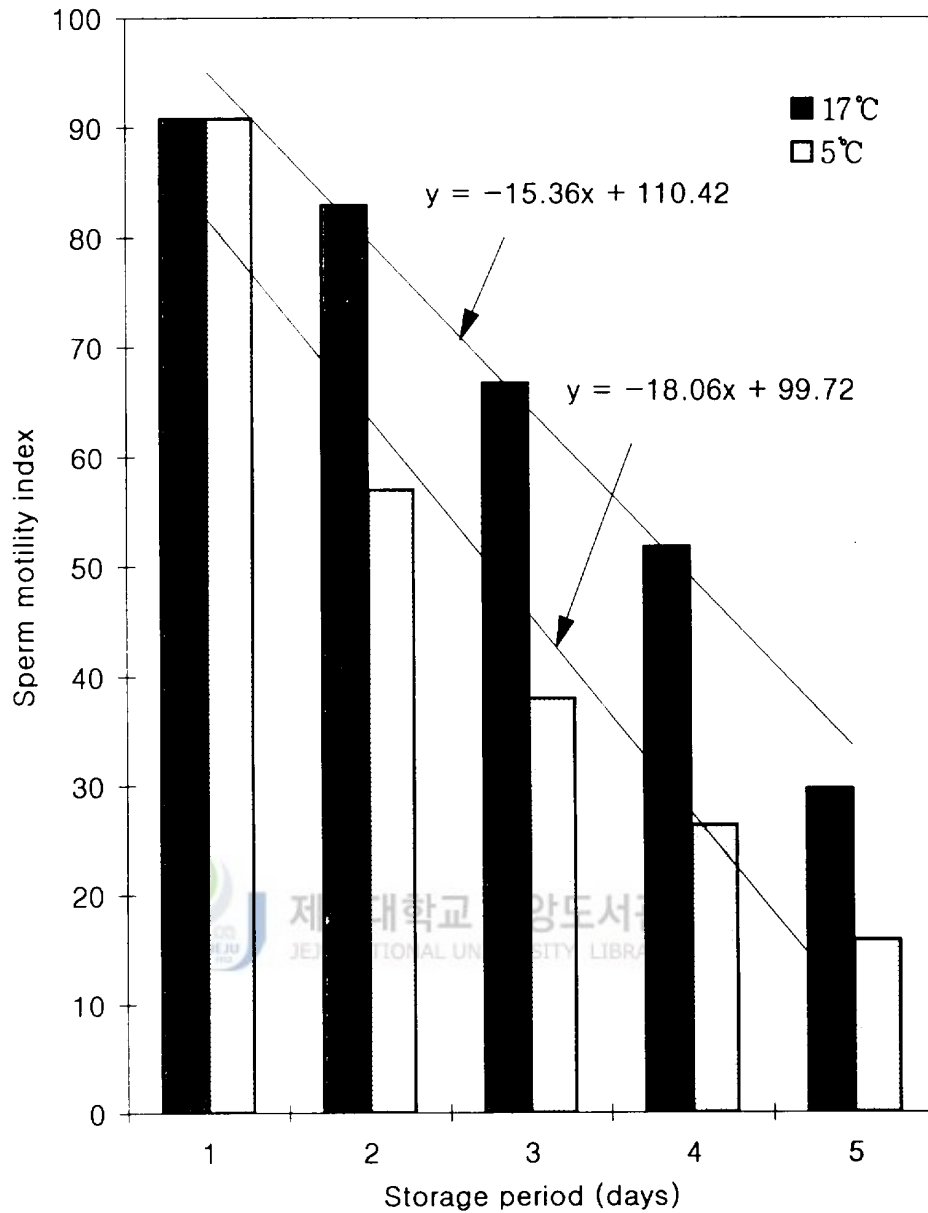


Fig. 2. Changes of sperm motility index of storage period and storage temperature in liquid boar semen diluted with trisaminomethane extenders.

3. Pursel, BL-2 및 Modena 保存液의 精子 生存指數

國內外에서 現在 사용되고 있는 많은 保存液들 중 豫備試驗에서 우수하게 나타난 Pursel, BL-2 및 Modena 保存液들에 대하여 保存溫度別 保存期間의 경과에 따른 精子의 生存指數를 試驗한 결과는 Table 4 및 Figure 3에 提示된 바와 같다.

上記 保存液들에 대하여 各各 原精液과 保存液을 1:4의 比率로 稀釋하여 保存溫度 17℃에서 保存期間 1日에서 5日까지 保存한 精子의 生存指數는 Pursel 保存液이 各各 90.0, 82.8, 76.9, 66.3, 55.0으로 精子의 平均 生存指數는 74.2로 나타났고, BL-2 保存液은 各各 90.0, 78.8, 67.5, 60.0, 42.2로서 平均 67.7이었으며, Modena 保存液에서는 90.0, 78.8, 71.3, 60.6, 49.1로 平均 70.0으로 나타났다.

保存液別로 保存期間 5日까지 精子의 平均 生存指數는 Pursel 保存液이 우수하게 나타났고, BL-2 保存液이 低調하게 나타났으나 有意差는 認定되지 않았으며, 또한 精子의 生存指數가 70.0 以上을 나타낸 期間은 Pursel 保存液과 Modena 保存液이 保存 3日로 同一한 成績을 보였으며, BL-2 保存液은 保存 2日까지로 나타났다.

保存溫度 5℃에서 保存 5日까지의 精子의 生存指數는 Pursel 保存液이 各各 90.0, 61.3, 47.5, 26.6, 14.4로 平均 48.0, BL-2 保存液에서는 各各 90.0, 61.3, 49.4, 26.6, 15.1로 平均 48.5, Modena 保存液에서는 90.0, 56.6, 41.6, 27.2, 16.6으로 平均 46.4로 나타났다.

保存期間別 精子의 生存指數를 保存液別로 比較해 볼때 保存 2日까지는 Pursel 保存液과 BL-2 保存液이 同等하면서 우수하게 나타났고, 保存 3日에는 BL-2 保存液이 良好하였으며, 保存 4日과 5日에서는 Modena 保存液이 우수하게 나타났다. 그리고 保存 5日까지의 精子의 平均 生存指數는 BL-2 保存液이 우수하였으나 保存液別로 有意差는 認定되지 않았다. 이렇게 同一한 保存溫度에서의 保存液別 有意差가 없는 理由는 우수하다고 立證된 保存液들을 對象으로 比較試驗하였기 때문이라고 생각된다.

保存溫度別 平均 精子의 生存指數는 17℃가 5℃보다 우수하게 나타나 有意差가 認定되었고($p < 0.001$), 保存期間別 및 保存溫度別로 保存期間이 경과할 수록 精子의 生存指數의 差異는 크게 나타나 保存溫도와 保存期間別 사이에도 有意差가 認定되었다($p < 0.001$).

Pursel 등(1973)에 의하면 돼지 原精液을 冷却하기전에 室溫(24~26℃)에서 1.5時間 및 7.25時間 동안 維持하여 5℃에 貯藏時 精子의 正常尖體와 運動性은 向上되었으며, 적절한 維持時間은 約 6時間으로 나타났다. 그리고 egg-yolk-glucose-bicarbonate (EGB) 稀釋液은 Beltsville L1(BL1)이나 Beltsville L2 (BL2) 稀釋液보다 正常尖體나 精子의 運動性이 보다 더 效果的으로 維持되었고, 維持時間을 4.25時間에서 7.25時間으로 하여 EGB 稀釋液으로 稀釋하였을 때 稀釋倍率(1:3, 1:6) 間에는 일정한 差異가 없었다. 維持時間 中에 EGB 稀釋液으로 稀釋한 精液은 5℃에 貯藏 中에 精子의 正常尖體나 運動性은 向上되지 않았다고 하였다. 그리고 돼지 精液을 15℃와 25℃에 貯藏時에는 尖體頭帽가 커지고 半月形모양이 不規則하게 되었고, 尖體는 15℃에 保存時 보다는 25℃에 保存時에 더 급속히 退化하였으며, citrate와 IVT 稀釋液보다는 tris와 saline 稀釋液에서 더 빨리 退化하였다. 또한 BL1, Purdue extender(PE), IVT(CO₂ 飽和) 稀釋液으로 稀釋된 精子의 正常頭帽를 가진 尖體와 運動性의 維持는 15℃와 25℃에서는 類似하였으며, IVT(CO₂ 除去) 稀釋液으로 稀釋된 精子는 25℃에서 尖體의 退化가 더 많았고, 精子의 運動性은 15℃와 25℃에서 더 낮게 나타났다. 尖體形態나 精子의 運動性이 가장 低調하게 나타난 保存液은 glucose-bicarbonate (GB) 稀釋液이었다고 報告하였다(Pursel 등, 1974).

原精液을 0℃, 5℃, 10 및 15℃에서 10分동안 培養하였을 경우에 低溫衝擊에 의하여 精子의 尖體가 變化하였고, 精子의 運動性도 減少하였으며, 精子의 尖體는 30℃에서 2.5時間과 4.5時間 培養 中에는 低溫衝擊에 대한 抵抗性이 向上되었다. 그리고 全精液의 尖體가 濃厚精液보다 低溫衝擊에 보다 더 影響을 많이 받았으며, tris-lactose, citrate 및 saline 溶液으로 稀釋한 精子의 尖體는 30℃에서 3~5時間 培養 中에 低溫衝擊에 대한 抵抗性이 向上되었으나, glucose-bicarbonate와 IVT 稀釋液에서 3~5時間 培養하였을 때에는 低溫衝擊에 대한

抵抗性이 向上되지 않았다고 하였다(Pursel 등, 1972).

Estienne 등(1989)은 4%와 10%의 bovine serum albumin(BSA)을 500ml의 funnel flask에 넣은 후 Beltsville Thawing Solution(BTS) 26ml로 稀釋한 精液을 BSA에 通過시키면 精液의 質은 돼지 個體에 따라 相異하였으나, 가장 아랫부분에서 分離된 精液이 正常頭帽를 가진 尖體와 運動性的의 比率이 높았다. 그리고 通過時間이 經過함에 따라 精子的 數도 增加하였으며, 分離된 精자의 質도 減少하지 않았고, 分離된 精자가 未分離된 精자보다 15℃에서 貯藏時 보다 더 耐性이 強하게 나타났다.

말의 精液에 있어서는 E-Z Mixin 稀釋液을 이용하여 稀釋時 原精液인 경우에는 7~8℃, 15℃ 및 室溫에서 保存 5時間 以後에는 精자가 거의 死滅한데 비하여 稀釋精液의 경우에는 7~8℃에서는 原精液보다 精자의 運動性이 우수하였고, 商業用 稀釋液인 non-fat dried milk-solids glucose를 이용하여 여러 가지 稀釋倍率로 試驗하였으나 7~8℃에서의 液狀保存이 가장 우수하였으나, 稀釋倍率간에는 커다란 差異가 없었다고 하였다(高 등, 1990). Padilla 등(1991)은 말 精자의 運動性은 0, 24, 48 및 72時間에서 Kenney's extender(KE)를 遠心分離한 精液에서는 各各 74%, 47%, 39%, 24%였으며, 遠心分離를 하지않은 精液에서는 各各 76%, 56%, 50%, 37%였으며, 遠心分離된 KMT에서는 各各 76%, 75%, 72%, 64%였고, 遠心分離를 하지않은 경우에는 各各 80%, 50%, 26%, 13%로 나타났다. 그리고 保存 24, 48 및 72時間 後에 稀釋液과 遠心分離사이의 相互作用에서는 半 以上の 變異가 나타났고, KE에 稀釋된 精液의 遠心分離는 精자에 해롭게 나타났으며, 遠心分離 後에 KMT로 稀釋된 精자의 運動性은 모든 處理에 있어서 가장 우수하였다($p < 0.05$)고 報告하였다.

Table 4. Sperm motility index* of liquid boar semen diluted with Pursel, BL-2, and Modena extenders at storage period and storage temperature of 17°C and 5°C.

Ext.	Storage temp.	Storage period of liquid semen (day)				
		1	2	3	4	5
Pursel	17°C	90.0±1.44 ^a	82.8± 2.07 ^a	76.9±0.63 ^a	66.3±5.05 ^a	55.0± 7.50 ^a
	5°C	90.0±1.44 ^a	61.3±11.06 ^a	47.5±9.13 ^{bc}	26.6±4.05 ^b	14.4± 1.08 ^b
BL-2	17°C	90.0±1.44 ^a	78.8± 4.15 ^a	67.5±4.08 ^{ab}	60.0±4.33 ^a	42.2±11.34 ^a
	5°C	90.0±1.44 ^a	61.3± 9.87 ^a	49.4±8.38 ^{bc}	26.6±0.93 ^b	15.1± 1.25 ^b
Modena	17°C	90.0±1.44 ^a	78.8± 4.15 ^a	71.3±4.62 ^a	60.6±3.44 ^a	49.1± 5.84 ^a
	5°C	90.0±1.44 ^a	56.6±12.53 ^a	41.6±9.23 ^c	27.2±6.00 ^b	16.6± 1.39 ^b

* Values are mean ± S.E. for 4 replicates.

** Values were high significance between of 17°C and 5°C (p<0.001)

*** Values were high significance with the passage of storage period (p<0.001)

a,b,c : Values in the same column with differing superscripts differ significantly (p<0.01)



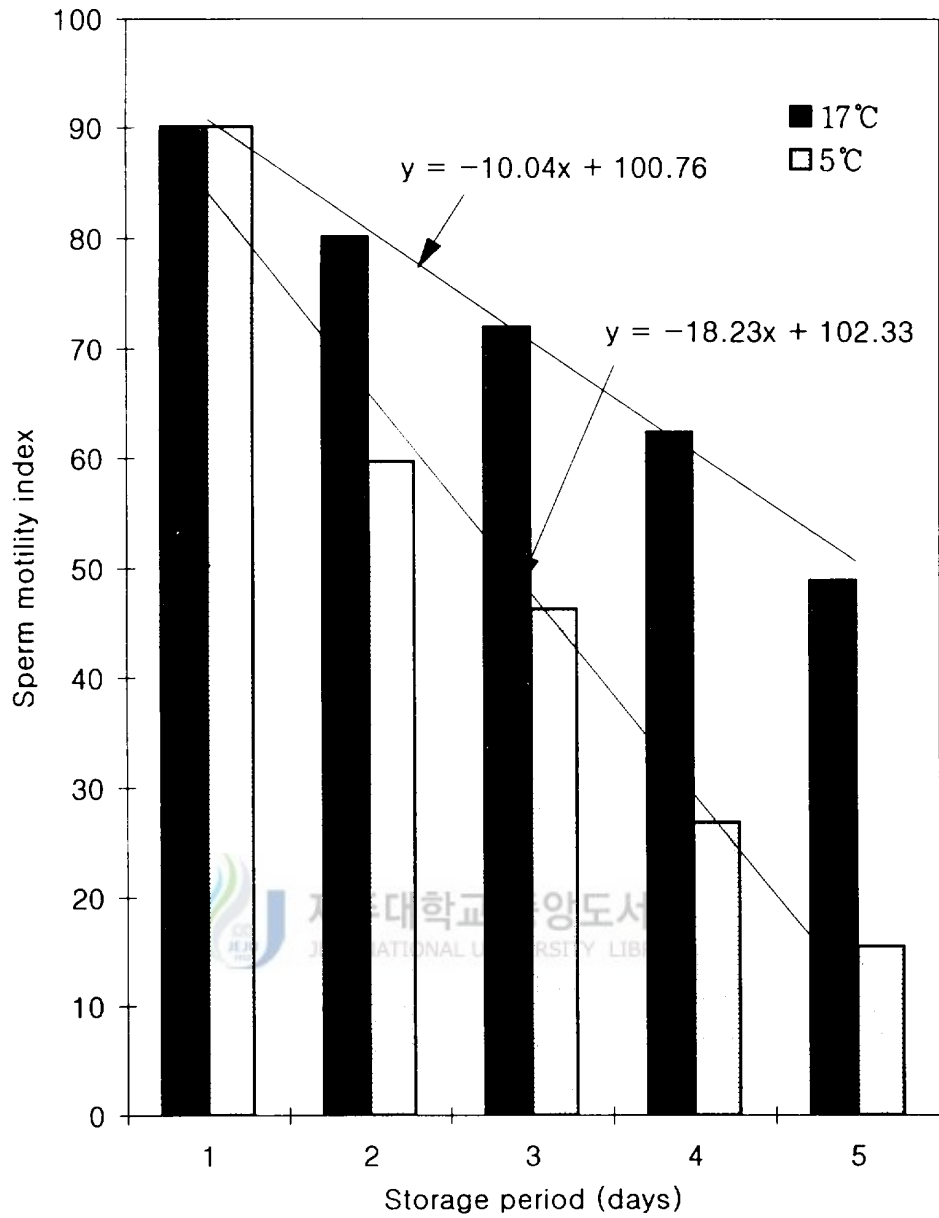


Fig. 3. Changes of sperm motility index of storage period and storage temperature in liquid boar semen diluted with Pursel, BL-2, and Modena extenders.

4. Pursel 保存液, Pursel 保存液에 各各 BSA, Ham's F10, TCM199 添加區
및 輸入保存液의 精子 生存指數 比較

Table 4에서 試驗한 保存液들 중 가장 우수하게 나타난 Pursel 保存液에 精子의 活力과 生存率을 높이고, 保存期間을 延長시키기 위하여 BSA (Bovine serum albumin)와 卵子的 保存液으로 利用되고 있는 Ham's F10 및 TCM199을 各各 1.0% 添加한 保存液, 그리고 現在 道內에서 輸入하여 사용하고 있는 保存液을 相互 比較하기 위하여 保存溫度 17℃에서 保存期間을 7日까지로 延長하여 精子의 生存指數를 試驗한 결과 Table 5와 같은 成績을 보여주었다.

Pursel 保存液(無處理區)의 保存期間 5日까지 精子의 生存指數는 各各 90.5, 81.8, 75.0, 65.5, 51.5, 41.3, 32.3으로 精子의 平均 生存指數 62.6에 비하여 BSA 添加區는 90.5, 85.0, 79.8, 74.0, 69.8, 69.2, 64.6으로 平均 76.1, Ham's F10 添加區는 90.5, 83.5, 78.0, 72.5, 63.0, 54.6, 44.5로 平均 69.5였다. 그리고 TCM199 添加區는 90.5, 84.0, 80.5, 76.0, 73.5, 68.0, 60.2로 平均 76.1, 輸入하여 사용되고 있는 保存液은 90.5, 80.4, 73.3, 64.0, 53.3, 48.0, 41.3으로 平均 64.4를 보여줌으로써 TCM199 添加區가 가장 良好하였다($p < 0.05$).

한편 上記 保存液들 중 保存 2日에는 BSA 添加區가 우수하였으나 保存 3日에서 7日까지는 TCM199 添加區가 가장 우수하였으며, Pursel 保存液이 가장 低調하게 나타나 有意差가 認定되었다($p < 0.05$). 그리고 保存 7日까지의 精子의 平均 生存指數는 BSA 添加區와 TCM199 添加區가 가장 우수하였고, 다음이 Ham's F10 添加區, 輸入 保存液, Pursel 保存液順으로 나타났으며, 保存期間別, 保存液別 및 保存期間의 경과에 따른 相互作用에서도 有意差가 認定되었다($p < 0.001$).

精子의 生存指數가 70.0 以上을 보인 期間은 無處理 Pursel 保存液이 保存 3日, BSA 添加區와 Ham's F10 添加區가 保存 4日로 거의 同一하였으며, TCM199 添加區는 5日, 輸入된 保存液은 3日까지로 TCM199을 添加한 保存液이 어느 保存液보다 保存期間이 길었다. 따라서 本 保存液에 稀釋된 精液을 人

I.授精에 사용할 수 있다고 假定한다면 Pursel 保存液은 保存 3日까지, BSA 添加區와 Ham's F10 添加區는 保存 4日까지, 輸入 保存液은 保存 3日까지, 또한 TCM199 添加區는 保存 5日까지도 使用이 可能하리라 생각되며 앞으로 受胎試驗을 實施하여 發表할 計劃에 있다.

그리고 效果的이고 經濟的인 保存液 製造를 위해서는 BSA 添加區와 TCM199 添加區에 대하여 添加水準別 比較試驗을 實施하여 적절한 添加水準을 決定하여야 할 것이다.

그러므로 精子의 生存指數가 우수하게 나타난 Pursel 保存液에 BSA, Ham's F10, TCM199 稀釋液을 各各 1.0%씩 添加하여 17℃에서 保存日別 精子의 生存指數를 試驗한 結果를 圖表로 提示하지 아니하였지만 BSA와 TCM199 添加區가 우수하게 보여주었기 때문에 Table 6에서는 前述한 2種類의 保存液에 대하여 적절한 添加水準(0.3, 0.6, 1.2%)을 決定하기 위하여 添加水準別 比較試驗을 實施한 바 그 結果는 다음과 같다.

保存 1日에서 5日까지 BSA 濃度別 精子의 生存指數는 0.3% 添加區에서는 各各 90.7, 85.8, 78.3, 73.5, 70.7로 精子의 平均 生存指數는 79.8로 나타났고, 0.6% 添加區에서는 90.7, 85.2, 79.5, 74.5, 70.8로 平均 80.1로 나타났다. 1.2% 添加區에서는 90.7, 86.2, 77.0, 72.5, 70.0으로 平均 79.3을 나타내어 保存 2日에는 1.2% 添加區가 가장 우수하였고, 保存 3日에서 5日까지는 0.6% 添加區가 우수하게 나타났으나 添加水準別로 有意差는 認定되지 않았다. 그리고 保存 5日까지의 平均 精子의 生存指數는 0.6% 添加區가 良好하였고, 다음이 0.3% 添加區, 1.2% 添加區順으로 나타났다.

또한 TCM199 添加水準別 精子의 生存指數는 0.3% 添加區에서는 保存 5日間 各各 90.7, 85.8, 79.5, 74.3, 71.5로 平均 80.4, 0.6% 添加區에서는 90.7, 86.8, 83.3, 76.7, 73.8로 平均 82.3, 1.2% 添加區에서는 90.7, 86.0, 77.0, 73.7, 70.8로 平均 79.6으로 保存 5日째까지 0.6% 添加區에서가 가장 좋았으며, 0.3% 添加區, 1.2% 添加區順이었으나 添加水準別로 有意差는 認定되지 않았다.

保存液別 添加水準은 BSA 添加區 및 TCM199 添加區에서 모두 0.6% 添加水準이 가장 적합하게 나타났으나 保存液別 添加濃도에 따른 有意差는 나타나지

않았고, 각각의 保存液의 添加濃度別로는 保存期間의 경과함에 따라 精子의 生存指數는 有意하게 낮았다($p < 0.001$).

朴 등(1990)은 1미 洗滌한 소의 新鮮한 精子를 heparin 1, 2, CSA 및 PC12가 各各 添加된 mTALP 溶液에서 15分間 培養하였을 때, 運動精子의 比率은 PC12가 有意하게 낮았으나, 尖體反應 精子比率은 오히려 PC12가 有意하게 높았다.

또한 新鮮한 精子를 2미 洗滌하고 heparin과 PC12를 各各 添加한 mTALP 溶液에서 15分間 培養하였을 때, 運動精子의 比率은 處理間 有意差가 없었으나 尖體反應 精子比率은 PC12 處理에서 有意하게 높았으며, 120分間 培養하였을 때에는 PC12의 運動精子의 比率은 heparin 處理보다 有意하게 낮았으나, 尖體反應 精子의 比率은 有意하게 높았다. 新鮮精子를 2미 洗滌하고 heparin이 添加된 mTALP 溶液에서 0, 15, 120 및 240分間 前培養한 다음 다시 PC12가 添加된 mTALP 溶液에서 15分間 培養하였을 때에 運動精子의 比率은 處理間에 有意差가 없었으나 尖體反應 精子의 比率은 120分과 240分이 有意하게 높았다.

PC12가 0, 75, 112.5 및 225 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 各各 處理된 mTALP 溶液에서 15分間 培養하였을 때, 運動精子의 比率은 225 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 水準 處理에서 有意하게 낮았으나, 尖體反應 精子比率은 오히려 有意하게 높았다. 그리고 돼지 凍結精液 保存液에 DMSO 및 글리세롤을 單獨으로 또는 竝用하여 添加하였을 경우에 돼지 精子의 生存性은 글리세롤만을 사용하였을 때보다 精子의 生存指數가 떨어졌고, heparin을 0, 5, 10 및 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 水準으로 添加한 mTALP 培養液에 소의 液狀精液을 15~840分間 培養하였을 때 精子의 活力은 heparin 濃度間에는 有意差가 없었으나 精子의 尖體反應率은 heparin 添加區가 無添加區보다 培養 15分 以後부터 有意하게 높았다고 報告하였다(Kojima, 1967 ; Bamba 등, 1972).

문 등(1990)은 돼지의 精液性狀에 影響을 미치는 lysine과 methionine을 混合 給與하여 給與水準別 精液性狀을 比較試驗 했던 바, lysine과 methionine을 補充 投與時가 그렇지 않았을 때보다 畸形精子 比率은 有意하게 낮았지만, 精子의 運動性에는 有意差가 없었다고 하였다. 朴 등(1991)은 소의 原精液을 Ca, BSA, heparin을 여러 가지로 組合(Ca, BSA, Ca+BSA, heparin, heparin+Ca, heparin+BSA, heparin+Ca+BSA)하여 添加한 sodium citrate solution(SCS)으로

稀釋하여 39℃에서 15分間 培養한 精子的 活力은 處理間에는 有意差가 認定되었다. 그리고 BSA 處理區에서 精子 活力은 다른 處理區보다 有意하게 높았고, 精子的 尖體反應率도 處理間에 有意差가 認定되었으며, BSA와 Ca+BSA 處理區가 다른 處理區보다 有意하게 높았다고 報告하여 向後 本 試驗에서도 amino acid 등을 利用한 試驗을 竝行하여야 한다고 생각된다.

또한 金 등(1975)의 報告에 의하면 保存 96時間까지의 液狀精液의 精子 生存指數는 glycerol 7% 添加區가 가장 良好하였고 DMSO와 ethylene glycol를 함께 添加한 區, 糖알콜 添加區, 糖類만을 添加한 處理區順으로 나타났으나 處理區別로 有意性은 없었으며, 돼지 凍結精液 保存液으로 開發한 保存液인 TCFG, CYSME, SMGE, CYGE 中 TCFG 保存液의 精子 生存指數가 가장 우수하였고, CYGE 保存液이 가장 低調하였으나 保存液別로 有意性은 없었다. 그리고 精漿을 除去한 것과 除去하지 않은 것을 比較하였을 때 精漿 除去區가 우수하였다.

溫度別로는 1次 射精液에서는 6~8℃ 保存보다 15~17℃ 保存下에서 精子 生存指數가 우수함을 보여주어 本 試驗結果와 類似하였고, 精漿 除去區에서는 오히려 15~17℃ 保存보다 6~8℃ 保存이 우수하게 나타나 1次 射精液과는 相反되는 結果를 나타내었다고 하였다. 그리고 Foley 등(1967)의 發表에 의하면 glucose 稀釋液을 이용하여 精液을 5倍로 稀釋한 후 37℃에서 12時間동안 嫌氣的 狀態로 培養시켰을 때에는 培養期間 동안에 精子的 運動性이 漸次的으로 減少하였고, glucose 및 fructose 稀釋液으로 精液을 各各 6倍로 稀釋시켜 嫌氣的 또는 好氣的 狀態下에서 培養時하여 두가지 稀釋液을 比較하였을 때 精子的 運動性은 fructose 稀釋液보다는 glucose 稀釋液이 더 높았다($p < 0.01$).

Table 5. Sperm motility index* of liquid boar semen diluted with Pursel extender containing BSA, Ham's F10, TCM199 media and imported extender at storage temperature of 17°C.

Extender	Storage period of liquid semen (day)						
	1	2	3	4	5	6	7
Pursel	90.5±1.22 ^a	81.8±1.92 ^a	75.0±1.94 ^a	65.5±3.98 ^a	51.5±6.78 ^b	41.3±8.36 ^b	32.3±5.94 ^b
Pursel + BSA	90.5±1.22 ^a	85.0±1.94 ^a	79.8±3.68 ^a	74.0±5.28 ^a	69.8±5.31 ^{ab}	69.2±6.33 ^a	64.6±6.54 ^a
Pursel + Ham's F10	90.5±1.22 ^a	83.5±2.45 ^a	78.0±3.30 ^a	72.5±5.42 ^a	63.0±6.49 ^{ab}	54.6±9.85 ^{ab}	44.4±2.64 ^{ab}
Pursel + TCM199	90.5±1.22 ^a	84.0±1.87 ^a	80.5±2.29 ^a	76.0±3.67 ^a	73.5±3.59 ^a	68.0±5.33 ^a	60.2±6.95 ^a
Imported extender	90.5±1.22 ^a	80.4±3.61 ^a	73.3±4.12 ^a	64.0±4.30 ^a	53.3±6.06 ^b	48.0±5.83 ^{ab}	41.3±4.53 ^{ab}

* Values are mean ± S.E. for 5 replicates.

** Values were high significance among extenders (p<0.001).

*** Values were high significance with the passage of storage period (p<0.001).

a,b : Values in the same column with differing superscripts differ significantly (p<0.01)

Table 6. Sperm motility index* of liquid boar semen diluted with Pursel extender containing levels of BSA and TCM199 medium concentration at storage temperature of 17°C

Ext.	Conc.	Storage period of liquid semen (day)				
		1	2	3	4	5
BSA	0.3	90.7±0.33 ^a	85.8±0.83 ^a	78.3±2.20 ^a	73.5±1.50 ^a	70.7±1.27 ^a
	0.6	90.7±0.33 ^a	85.2±1.45 ^a	79.5±1.53 ^a	74.5±2.08 ^a	70.8±1.67 ^a
	1.2	90.7±0.33 ^a	86.2±0.67 ^a	77.0±2.78 ^a	72.5±2.08 ^a	70.0±2.50 ^a
TCM199	0.3	90.7±0.33 ^a	85.8±0.83 ^a	79.5±2.93 ^a	74.3±2.05 ^a	71.5±1.53 ^a
	0.6	90.7±0.33 ^a	86.8±0.67 ^a	83.3±0.83 ^a	76.7±3.00 ^a	73.8±2.03 ^a
	1.2	90.7±0.33 ^a	86.0±1.76 ^a	77.0±2.78 ^a	73.7±2.17 ^a	70.8±1.45 ^a

* Values are mean±S.E. for 4 replicates.

** Values were high significance with the passage of storage period (p<0.001)

5. Pursel 保存液에 BSA와 TCM199 添加水準別 精자의 尖體形態

精자의 生存指數가 우수하게 나타난 두 保存液에 대하여 BSA와 TCM199 添加水準別로 精子尖體의 正常 頭帽率을 比較試驗한 결과 Table 7과 같은 成績을 얻었다.

保存期間 1日에서 5日까지 BSA 添加水準別 精자의 正常 頭帽率은 0.3% 添加水準에서는 各各 91.3, 85.6, 80.0, 73.7, 70.3으로 平均 80.2였으며, 0.6% 添加水準에서는 91.3, 86.0, 80.7, 75.0, 70.6으로 平均 80.7, 1.2% 添加水準에서는 91.3, 86.7, 80.3, 76.3, 69.3으로 平均 80.8로 나타났다. 保存期間別에서는 保存 2日째까지는 1.2% 添加水準이, 保存 3日에는 0.6% 添加水準이, 保存 4日에는 1.2% 添加水準이, 保存 5日에는 0.6% 添加水準이 우수하게 나타났으나 添加水準別 有意差는 認定되지 않았다. 그리고 保存 5日까지의 精자의 平均 正常 頭帽率은 1.2% 添加水準이 가장 우수하게 나타났고, 다음이 0.6% 添加水準, 0.3% 添加水準順이었다.

TCM199의 添加水準別 比較試驗에서는 0.3% 添加水準이 保存期間 5日까지 精자의 正常 頭帽率은 各各 91.3, 87.0, 83.7, 74.6, 70.6으로 精자의 平均 正常 頭帽率은 81.4였고, 0.6% 添加水準에서는 91.3, 88.7, 86.3, 77.7, 68.3으로 平均 82.5였으며, 1.2% 添加水準에서는 91.3, 87.6, 83.0, 74.3, 69.6으로 平均 81.2로 나타났다. 保存期間別로는 保存 2日에서 4日까지는 0.6% 添加水準이 우수하였고, 保存 5日에는 0.3% 添加水準이 良好하였으나 保存 5日까지의 精자의 平均 正常 頭帽率은 0.6% 添加水準이 매우 좋았으며 0.3% 添加水準, 1.2% 添加水準順으로 나타났으나 添加水準別 有意差는 認定되지 않았다.

그리고 保存液別 및 保存期間別로도 正常 頭帽率은 有意差가 나타나지 않았으나, BSA에서는 0.3% 添加水準이, TCM199에서는 0.6% 添加水準에서 正常 頭帽率이 가장 良好하였으며, 또한 保存液別 및 添加水準別에 관계없이 保存 5日까지도 精자의 生存指數가 70+++ 이상을 나타내어 人工授精에 利用이 可能할 것으로 推測되었다.

朴 등(1989)에 의하면 原精液과 稀釋精液의 精子 運動性과 NAR尖體의 比率은 5℃나 37℃에서 培養時 보다 22℃에서 培養했을 경우가 더 높았고($p < 0.01$), 특히 5℃에 保存時에는 0.5時間, 3時間 및 6時間 培養時 精子의 運動性과 NAR尖體의 比率은 급격한 減少를 나타내었으며, 原精液과 稀釋液의 比率은 1:1, 1:2, 1:4인 경우가 1:6의 경우보다 더 높다($p < 0.01$)고 報告하였다. 그리고 Bamba 등(1985)은 돼지 液狀精液의 濃厚部分을 BF5 稀釋液으로 1:1의 比率로 미리 稀釋하여 1.5時間에 걸쳐 5℃로 溫度를 떨어뜨린 稀釋精液을 各各 37℃로 加溫된 BTS 稀釋液으로는 1:8의 比率로, KRP 稀釋液으로는 1:6.5의 比率로 稀釋하였을 경우에 尖體의 被害는 주로 급속히 加溫시킬 경우에 나타났으며, 精子의 運動性에 있어서는 稀釋된 精液을 급속히 冷却시키거나, 급속히 加溫시킬 때에는 影響이 적었다고 하였는데 本 試驗에서는 濃厚部分만을 採取하지 않아 成績이 어긋났으나 앞으로 계속 分離採取를 하여 比較할 必要가 있다고 忖料된다. 또한 BF5 稀釋液으로 精液을 稀釋하여 스트로우 液狀精液으로 5℃에 保存時 精子의 運動性은 保存 6日까지는 統計的 有意性을 認定할 수가 없었지만 保存 7日째에는 有意差가 認定되었고($p < 0.01$), 正常尖體의 變化는 保存 3日째까지는 統計的 有意差가 認定되지 않았으나 4日째부터는 有意差가 認定되었다고($p < 0.01$) 報告하여 本 成績과 類似하였다(鄭 등, 1989).

최근 Park 등(1996)은 돼지 液狀精液을 Lactose-Egg yolk와 Butschwiler 稀釋液으로 稀釋하여 稀釋液間에 保存溫度別 差異 및 Lactose-Egg yolk 稀釋液에서의 glycerol 濃度を 調査한 바 5℃의 冷藏庫에 保存하였을 경우 精子의 運動性은 全體 保存期間동안 Lactose-Egg yolk 稀釋液이 有意하게 높았으나 ($p < 0.05$), 正常尖體比率은 두 稀釋液 間에 差異가 없었으며, 15℃에 保存時에는 精子 運動性과 正常尖體比率이 3日부터 7日까지는 Lactose-Egg yolk 稀釋液보다 Butschwiler 稀釋液이 有意하게 높았다. 그리고 Lactose-Egg yolk 稀釋液을 이용한 돼지 液狀精液의 glycerol 濃도는 2%일 때 精子의 運動性과 正常尖體比率이 가장 우수하였다고 發表하였다.

Table 7. Percentage of NAR* on the liquid boar semen diluted with Pursel extender containing levels of BSA and TCM199 medium concentration at storage temperature of 17°C.

Ext.	Conc.	Storage period of liquid semen (day)				
		1	2	3	4	5
BSA	0.3	91.3±0.33 ^a	85.6±0.83 ^a	80.0±5.19 ^a	73.7±4.63 ^a	70.3±5.24 ^a
	0.6	91.3±0.33 ^a	86.0±0.76 ^a	80.7±4.91 ^a	75.0±4.62 ^a	70.6±4.06 ^a
	1.2	91.3±0.33 ^a	86.7±0.67 ^a	80.3±5.24 ^a	76.3±4.67 ^a	69.3±4.67 ^a
TCM199	0.3	91.3±0.33 ^a	87.0±2.08 ^a	83.7±2.40 ^a	74.6±3.28 ^a	70.6±2.19 ^a
	0.6	91.3±0.33 ^a	88.7±0.33 ^a	86.3±0.67 ^a	77.7±2.60 ^a	68.3±2.03 ^a
	1.2	91.3±0.33 ^a	87.6±0.33 ^a	83.0±1.15 ^a	74.3±1.76 ^a	69.6±1.86 ^a

* Values are mean ± S.E. for 4 replicates.

7. 保存液別 經濟性 比較分析

本 試驗에서 얻은 精子的 生存指數가 우수한 保存液들과 輸入 保存液을 購入 時 價格基準으로 經濟性을 比較分析한 바, Pursel 保存液의 製造價格은 820원, BL-2 保存液은 2,500원, Modena 保存液은 8,550원으로 調査되었다. 그리고 Pursel 保存液에 添加한 BSA, Ham's F10, TCM199의 添加水準 濃度는 1.0%을 基準으로하여 製造價格을 算出하였을 때 BSA 添加區는 8,970원, Ham's F10 添加區는 990원, TCM199 添加區는 940원으로 調査되었고, 輸入 保存液은 9,000원 으로 調査되었다. 그 結果 Pursel 保存液의 製造價格이 가장 낮았고, 輸入 保存液과 BSA 添加區 保存液 가장 높았다. 그러나 Pursel 保存液은 液狀狀態로 5日 동안 保存하였을 경우에는 精子的 生存指數가 낮아 利用이 어렵다고 생각되며, TCM199 添加한 保存液은 製造價格이 低廉하여 보다 經濟的일 뿐만 아니라 精子的 生存指數도 가장 우수하게 나타났다.



IV. 摘 要

本 研究는 돼지 精液을 液狀狀態로 保存하는데 있어서 精子의 生存指數 및 正常 頭帽比率이 우수하고, 또한 보다 經濟的인 保存液을 開發하기 위하여 保存液別, 保存期間別 및 保存溫度別로 精子의 生存指數 및 正常 頭帽比率 試驗을 實施하였으며, 그 얻어진 結果를 要約하면 다음과 같다.

1. 소의 液狀精液 保存用인 IVT 稀釋液, CUE 保存液, 變形시킨 mIVT 稀釋液 및 mCUE 保存液을 돼지 精液에 이용할 때 精子의 生存指數는 保存溫度 17℃, 保存期間 5日에서 mCUE 保存液이 가장 우수하게 나타났으나 保存液別로는 有意差가 認定되지 않았다. 그리고 精子의 生存指數가 70.0 이상을 나타낸 保存液과 期間은 mIVT 保存液이 2日 및 mCUE 保存液이 3日 이었다.

5℃에서는 CUE 保存液이 제일 良好한 精子 生存指數를 보였으나, 保存液別로는 有意差가 認定되지 않았으며, 精子의 生存指數가 70.0 이상을 보인 保存液은 없었다. 保存溫度別 精子의 平均 生存指數는 17℃가 5℃보다는 우수하였으며 ($p < 0.001$), 同一한 保存溫度에서도 保存期間이 경과함에 따라 有意하게 下落하였다 ($p < 0.001$).



2. 緩衝劑로 이용되고 있는 trisaminomethane을 위주로 調製한 保存液別 및 保存溫度別 精子의 生存指數는 17℃에서는 tris-D 保存液이 良好하였으나 有意差는 認定되지 않았다. 그리고 精子의 生存指數가 70.0 이상을 나타낸 保存液 및 期間은 tris-A, tris-B, tris-C 保存液이 保存 2日로 나타났으며, tris-D 保存液에서는 3日로 나타났으나 有意差는 認定되지 않았다.

保存溫度 5℃에서는 tris-A 保存液이 精子 生存指數가 良好하게 나타났으나, 保存液間에 有意差는 認定되지 않았으며, 精子의 生存指數가 70.0 이상을 나타낸 保存液은 없었다. 그리고 保存溫度別 精子의 平均 生存指數는 5℃보다는 17℃가 우수하게 나타났고 ($p < 0.001$), 保存期間의 경과함에 따라 漸次로 떨어졌다 ($p < 0.001$).

3. 國內外에서 使用되고 있는 Pursel 保存液, BL-2 保存液, Modena 保存液을 이용한 保存溫度別 精子의 生存指數는 17℃에서는 Pursel 保存液이 우수하였으나 有意差는 認定되지 않았다. 精子의 生存指數가 70.0 以上을 보인 期間은 Pursel 保存液과 Modena 保存液이 3日, BL-2 保存液이 2日로 나타났다. 5℃에서는 保存期間 5日에서 Modena 保存液이 우수하였으나 역시 保存液間에는 統計的 有意差가 없었으며, 精子의 生存指數가 70.0 以上을 나타낸 保存液은 없었다. 그리고 保存溫度別로는 5℃보다는 17℃에서가 우수하게 나타났으며 ($p < 0.001$), 역시 保存期間이 經過할 수록 漸次로 낮아졌다($p < 0.001$).

4. Pursel 保存液과 이 保存液에 BSA, Ham's F10, TCM199을 各各 1.0%씩 添加한 保存液 및 輸入 保存液에서의 保存溫度 17℃와 保存期間 7日까지 精子의 生存指數는 BSA 添加區가 가장 우수하였으며($p < 0.05$), 保存液別 精子의 生存指數가 70.0 以上을 보인 期間은 Pursel 保存液이 3日인데 反하여, BSA 添加區 및 Ham's F10 添加區에서는 4日, TCM199 添加區에서는 5日로 나타났고, 輸入 保存液에서는 3日로 짧았다.

5. Pursel 保存液에 精子의 生存指數가 우수하게 나타난 添加劑인 BSA와 TCM199에 대하여 적절한 添加水準을 決定하기 위한 實驗에서 BSA 添加區에서는 保存期間 5日에서 0.6% 添加水準이 가장 우수하였고, 1.2% 添加水準이 低調하게 나타났으나 有意差는 認定되지 않았다. TCM199 添加區에서도 BSA 添加區에서와 마찬가지로 0.6% 添加水準이 우수하였고, 1.2% 添加水準이 低調하게 나타났으나 添加水準別에 따른 有意差는 認定되지 않았다.

6. Pursel 保存液에 BSA 및 TCM199 添加水準別로 正常 頭帽比率을 調査한 바, BSA 添加區에서는 0.6% 添加水準이 가장 良好하였고, 1.2% 添加水準이 가장 低調하였으나 添加水準別에 따른 有意差는 認定되지 않았다. 반면 TCM199 添加區에서는 0.3% 添加水準이 가장 良好하였고, 0.6% 添加水準이 가장 低調하였으나, 添加水準別에 따른 統計的 有意差는 認定되지 않았다.

7. 保存液 1,000ml을 製造하는데 있어서는 Pursel 保存液에 BSA 및 TCM199 添加한 것이 輸入 保存液보다 價格이 低廉할 뿐만 아니라 精子의 生存指數도 우수하게 나타났다. 그러나 BSA 添加區는 製造價格이 高價로 道內에서 保存液을 利用할 경우에는 TCM199 0.6% 添加水準이 가장 適合하고 經濟的인 保存液으로 認定되었다.

參 考 文 獻

- Aalbers, J.G., J.H.M. Rademaker, H.J.G. Grooten and L.A. Johnson. 1983. Fecundity of boar semen stored in BTS, Kiev, Zorlesco and Modena extenders under field conditions. *J. Animal. Sci.* 57 (Suppl.). 314 (Abstr.)
- Aamdal, J. and I. Hogset. 1957. Artificial insemination in swine. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 131 : 59~64.
- Ahmed, N.A., M.H. Salem, H.A. El-Oksh and V.G. Pursel. 1984. Effect of incubation conditions, inhibitors and seminal plasma on protein synthesis in ram spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 71 : 213~219.
- Back, D.G., B.W. Pickett, J.L. Voss and G.E. Seidel, Jr. 1975. Effect of antibacterial agents on the motility of stallion spermatozoa at various storage times, temperatures and dilution ratios. *J. Animal Sci.* 41(1) : 137~143.
- Bamba, K. I. Iida, and Y. Kojima. 1972. Studies on deep freezing of boar semen. IX. Combined use of glycerol and DMSO for the preservation of boar spermatozoa. *Jap. J. Animal Reprod.* 18(1) : 34~36.
- Bamba, K. and D.G. Cran. 1985. Effect of rapid warming of bar semen on sperm morphology and physical. *J. Reprod. Fert.* 75 : 133~138.
- Bariteau, F., J. Bussiere and M. Covrot. 1977. Artificial insemination in the pig. Technical improvement and recent results. France *J. Recherche Porcine.* H-14.



- Blackshaw, A.W. 1954. The prevention of temperature shock of bull and ram semen. *Aust. J. Bil. Sci.* 7 : 573.
- Blackshaw, A.W. and C.W. Salisbury. 1957. Factors influencing metabolic activity of bull spermatozoa. II. Cold shock and its prevention. *J. Dairy Sci.* 40 : 1099.
- Crabo, B.G. and S. Einarsson. 1971. Fertility of deep frozen boar spermatozoa. *Acta. Vet. Acznd.* 12 : 125~127.
- Davis, I.S., R.W. Bratton, and R.H. Foote. 1963. Viability of bovine spermatozoa at 5, -25, and -85°C in Tris-buffered and citrate-buffered yolk-glycerol extenders. *J. Dairy. Sci.* 46 : 333~336.
- Du Mesnil Du Buisson, F. and L. Dautier. 1958. Maintien du pou voir fecondant du sperme de verrat en presence de CO₂. *Compt. Rend. Acad. Sci.* 274 : 2472.
- Estienne, M.J., J.W. Knight and W.E. Beal. 1989. Long-term liquid storage of porcine spermatozoa seperated using a discontinuous bovine serum albumin gradient. *J. Animal Sci.* 67 : 1497~1502.
- Foley, C.W., H.M. Marsh, C.J. Heidenreich, V.A. Garwood and R.E. Erb. 1967. Effects of zero and three-day storage of washed boar spermatozoa on subsequent incubation characteristic. *J. Animal Sci.* 26 : 1072~1077.
- Gilbert, G.R. and J.O., Almquist. 1978. Effects of processing procedures on post-thaw acrosomal retention and motility of bovine spermatozoa packaged in 0.3mℓ straws at room temperature. *J. Anim. Sci.* 46(1) : 225~231.

- Gottarai, L., L. Brunel, and L. Zanelli. 1980. New dilution media for artificial insemination in pigs. Proc. 9th Int. Congr. Anim. Reprod. A.I., Madrid. 3 : 275.
- Graham, E.F., B.G. Crabo, and M.M. Pace. 1978. Current status of semen preservation in the ram, boar and stallion. J. Anim. Sci. 47, Suppl. II. 80~119.
- Hafez, E.S.E. 1980. Reproduction in farm animals. 4th edition. in Secretion of the male reproductive tract and seminal plasma. pp. 189~202.
- Johnson, L.A., J.G., Aalbers, C.M.T., Willems, and W. Sybesma. 1979. Effectiveness of fresh and frozen boar semen under practical conditions. J. Anim. Sci. 49. (Suppl. I) : 306.
- Johnson, L.A., J.G., Aalbers, C.M.T., Willems, and J.H.M. Rademaker. 1980. Fertility of boar semen stored in BL-1 and Kiev extenders at 18°C for three days. Proc. 5th Int. Pig Vet. Soc. Copenhagen. 33.
- King, G.J. and J.W. Macpherson. 1966. The effect of glycerol on fertility of liquid boar semen. A.I. Digest. 14 : 6~7.
- King, G.J. and J.W. Macpherson. 1973. A comparison of two methods for boar semen collection. J. Animal Sci. 36(3) : 563~565.
- Kojima, Y., K.I. Bamba and S. Kobayashi. 1967. Additional effects of DMSO as a protective agent. Jap. J. Animal Reprod. 13 : 149.

- Kruger, T.F., S.B. Ackerman, K.F. Simonmons, R.J. Swanson, S. Brugo, and A.A. Acosta. 1987. A quick, reliable staining technique for human sperm morphology. *Arch Androl.* 18 : 275.
- Mann, T. and C. Lutwak-Mann. 1955. Biochemical changes underlying the phenomenon of cold shock in spermatozoa. *Arch. Sci. Biol.* 39 : 578.
- Mayer, D.T. 1955. THE chemistry and certain aspects of the metabolic activities of mammalian spermatozoa. *Mich. State Univ. Cent. Sympos. Reprod. Infertil.* 45.
- Ool, S.K.H. 1976. Further studies on the preservation of boar semen in Illini variable Temperature (IVT) diluent. *Kajian veterinal.* 7(1) : 27~30.
- Padilla, A.W. and R.H. Foote. 1991. Extender and centrifugation effects on the motility patterns of slow-cooled stallion spermatozoa. *J. Anim. Sci.* 69 : 3308~3313.
- Park, C.S., Y.M. Cheon and Z. Xu. 1996. Comparison of preservation of liquid boar semen between Lactose-Egg Yolk and Butschwiler diluents. *Kor. J. Animal Reprod.* 20(2) : 101~109.
- Phillips, P.H. 1939. The preservation of bull semen. *J. Biol. Chem.* 130 : 415.
- Phillips, P.H. and H.A. Lardy. 1940. A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen. *J. Dairy Sci.* 23 : 399.
- Plishko, N.T. 1966. A method of prolonging the viability and fertilizing ability of boar spermatozoa. *Anim. Breed. Abstr.* 34 : 89.

-
- Polge, C. 1956. The development of an artificial insemination service for pigs. Anim. Breed. Abst. 24 : 209.
- Potter, W.L., P.C. Upton and B.L., Dunn. 1979. Morphological changes as observed by light microscopy of the acrosome of boar spermatozoa subjected to deep freezing. Aust. J. Biol. Sci. 32 : 575.
- Pursel, V.G., L.A. Johnson and G.B. Rampaceks. 1972. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. J. Animal Sci. 34(2) : 278~283.
- Pursel, V.G., L.A. Johnson and L.L. Schulman. 1972. Interaction of extender composition and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. J. Animal Sci. 35(3) : 581~584.
- Pursel, V.G., L.A. Johnson and L.L. Schulman. 1972. Effect of dilution, seminal plasma and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. J. Animal Sci. 37(2) : 528~531.
- Pursel, V.G., L.A. Johnson and L.L. Schulman. 1973. Fertilizing capacity of boar semen stored at 15°C. J. Animal Sci. 37(2) : 532~535.
- Pursel, V.G., L.L. Schulman, and A. Johnson. 1973. Effect of holding time on storage of boar spermatozoa at 5°C. J. Animal Sci. 37(3) : 785~789.
- Pursel, V.G., L.A. Johnson and L.L. Schulman. 1974. Acrosome morphology of boar spermatozoa during *in vitro* aging. J. Animal Sci. 38(1) : 113~116.

- Pursel, V.G., L.L. Schulman, and A. Johnson. 1978. Effect of Orvus ES Paste on acrosome morphology, motility and fertilizing capacity of frozen-thawed boar sperm. *J. Animal Sci.* 47(1) : 198~202.
- Salem, M.H., M.Y. Mekkawy, N.A. Ahmed, I.Y. Abdel-Aziz, A.A. Mohamed, H.A. EL-Oksh and V.G. Pursel. 1992. Effect of cyclic AMP on fructose utilization, progressive motility and protein synthesis by ram spermatozoa. *Theriogenology*. 37 : 1061~1074.
- Senegcnik, J. 1968. The effect of various factors on the viability of boar semen. *Vet. Glasan.* 22 : 441~445.
- Sorensen, Jr.A.M. 1979. *Animal reproduction principles and practices.* Chapter 6 : Semen production, processing and storage. pp. 152~179. McGraw-Hill Book Company, New York.
- Vandemark, N.L., and U.D. Sharma. 1957. Preliminary fertility results from the preservation of bovine semen at room temperature. *J. Dairy Sci.* 40 : 438~439.
- 廣野 森, 加藤征史郎, 入谷 明. 1976. 凍結精液研究會會報. 50 : 8~10.
- 加藤征史郎, 井上陽一, 宏野森, 入谷明, 西川義正. 1976. 凍結豚精子の運動性および頭帽の形態に及ぼす融解方法の影響. *日本凍結精液研究會會報.* 48 : 15.
- 康珉秀, 正木淳二. 1982. 綿羊精子の代謝能に及ぼすステロトホルモンの影響. *日本家畜人工授精研究會誌.* 3 : 56.

- 고태혁, 김한섭, 이상호, 송해범. 1990. Thoroughbred 精液의 液狀保存에 관한 연구. 韓國家畜繁殖學會誌. 14(3) : 199~204.
- 橋 爪, 丹羽太左衛門. 1976. 牛および豚の精液の凍結保存における稀釋液の條件が精子のacrosomic systemに及ぼす影響について.
- 金善煥, 金敬珠, 朴喜圭, 李在根. 1976. 豚 精液 保存에 關한 研究, 第Ⅱ報 : 各種稀釋液이 豚精液 保存性에 미치는 影響. 韓國畜産學會誌. 18(5) : 392~396.
- 金善煥, 金敬珠, 李在根, 朴喜圭. 1976. 豚 精液 保存에 關한 研究, 第Ⅲ報 : 豚精液 液狀 保存液 開發에 關한 試驗. 韓國畜産學會誌. 18(5) : 397~402.
- 金善煥, 金敬珠, 朴喜圭. 1977. 豚 精液 保存에 關한 研究, 第Ⅳ報 : 豚精液 液狀 保存液 改良試驗. 韓國畜産學會誌. 19(4) : 267~274.
- 金重柱, 徐國聖, 申源執, 任京淳, 薛東攝, 李用彬. 1975. 돼지의 冷凍精液 製造過程이 精液性狀과 受胎에 미치는 影響. 農事試驗研究報告. 7 : 11~20.
- 金學奎, 高文行, 金仁哲, 鄭幸基, 李光源, 孫東秀, 金 炫, 池高夏, 朴昌植. 1989. 液體窒素 콘테이너를 이용한 돼지 精液의 凍結. 韓國畜産學會誌. 31 : 155~157.
- 金仁哲, 金學奎, 金明直, 高文錫, 孫東洙, 崔進成, 朴泰管. 1992. 돼지 冷凍精液의 受胎率 및 産仔數 調査. 調査研究事業報告書. 國立種畜院. pp. 34~37.
- 丹羽太左衛門, 瑞穗 當, 副島昭彦. 1955. 家畜繁殖誌. 1 : 21.
- 丹羽太左衛門, 瑞穗 當, 副島昭彦. 1960. 農業技術研究所報告. 19, 25, 39.

- 丹羽太左衛門, 柘田精一, 西川義正, 吉岡善三郎. 1970. 家畜の人工授精. 名文書房. 東京.
- 문승주, 임계택. 1990. 돼지의 精液性狀에 관한 研究. 韓國家畜繁殖學會誌. 14(2) : 141~146.
- 朴昌植, 梁文韓, 黃德洙, 李揆丞. 1989. 韓國在來山羊精자의 液狀 및 凍結保存에 관한 研究. 韓國畜産學會誌. 31(7) : 412~419.
- 朴永植, 任京淳. 1990. Heparin, Chondroitin Sulfate A (CSA) 및 Dilauroyl-phosphatidyl-choline (PC12)이 소 精자의 活力과 尖體反應에 미치는 影響. 韓國家畜繁殖學會誌. 14(4) : 297~302.
- 朴永植, 任京淳. 1990. Heparin이 소 精자의 受精能獲得反應에 미치는 影響에 관한 研究. 韓國家畜繁殖學會誌. 14(4) : 303~308.
- 朴永植, 任京淳. 1990. Dilauroylphosphatidyl-choline (PC12)이 소 精자의 受精能獲得에 미치는 影響에 관한 研究. 韓國家畜繁殖學會誌. 14(4) : 309~313.
- 朴永植, 任京淳. 1991. Ca, BSA, Heparin, 精液의 貯藏 및 수소 個體가 精자의 活力과 尖體反應에 미치는 影響. 韓國家畜繁殖學會誌. 15(1) : 1~6.
- 尙炳贊, 金仁哲, 盧晉植, 金浩重, 朴泰管, 趙閔珩, 池高夏, 任京淳. 1984. 導入한 돼지 凍結精液의 精子活力과 繁殖能力. 韓國畜産學會誌. 26 : 658~662.
- 西川(義). 1951. 家畜人工授精法. 養賢堂. 東京.
- 伊藤祐之, 丹羽太左衛門, 工藤 篤. 1948. 畜産試驗場報告. 55.

李用斌. 1991. 家畜人工授精要論. 先進文化社. pp. 258~267.

任京淳. 1962. 粉末脫脂乳 保存液이 豚精液의 活力 및 pH에 미치는 影響. 韓國畜産學會誌. 4 : 51~57.

任京淳, 鄭揚龍. 1978. 豚精液의 凍結保存에 關한 研究. I. 保存液의 組成 및 凍結條件이 融解後 豚 精子의 生存性에 미치는 影響. 韓國畜産學會誌. 20(6) : 586~591.

任京淳, 鄭揚龍. 1979. 豚精液의 液狀 및 凍結보존에 關한 研究. III. 保存液이 液狀精液의 精子 生存性과 受胎率에 미치는 影響과 稀釋方法과 容器가 凍結精液이 生存性에 미치는 影響. 韓國家畜繁殖研究會報. 3(1) : 30~35.

鄭吉生. 1995. 家畜繁殖生理學. 先進文化社. pp. 228~248.

鄭洪基, 宋雨石, 朴昌植. 1987. 導入한 돼지 凍結精液의 繁殖能力에 關한 研究. 韓國家畜繁殖學會誌. 11 : 22~25.

鄭幸基, 金學奎, 高文石, 金仁哲, 崔震成, 李光源, 孫東秀, 金 炫, 池高夏, 朴昌植. 1989. 5ml 스트로에 保存한 돼지 液狀精液의 生存性과 受精能力에 關한 研究. 韓國畜産學會誌. 31(3) : 158~161.

槽谷 泰, 河部和雄. 1977. 畜産の研究. 31 : 1471~1477.

和出 靖, 副島昭彦, 栢田博司, 原島昇昱. 1977. 家畜精液の液狀及び凍結保存に關する研究. II. 豚凍結精液の生存性及び受胎力. 家畜繁殖誌. 23 : 105~111.

黃德洙, 梁文韓, 李揆丞, 朴昌植. 1989. 液狀 및 凍結保存된 韓國 在來山羊 精子의 運動性 및 尖體에 關한 研究. 韓國畜産學會誌. 13(1) : 18~25.

感謝의 글

本 論文을 完成하기까지 자상하게 때로는 嚴하게 指導하여 주신 김중계 教授님께 眞心으로 感謝를 드리며, 바쁘신 가운데도 論文審査를 맡아주신 강민수 教授님, 김문철 教授님, 또한 過程동안 많은 激勵을 해주신 畜産學科 教授님들께 깊은 感謝를 드립니다.

그리고 바쁜 業務에도 공부를 할 수 있도록 細心하게 配慮하여 주신 本 研究院 高용구 院長님을 비롯하여 同僚 職員 여러분에게도 감사를 드리며, 아울러 實驗에 많은 도움을 준 繁殖學 實驗室의 이재익 後輩 및 여러분들에게도 고마운 마음을 전합니다.

오늘에 있기까지 불평 한마디 없이 정성으로 內助해 준 사랑하는 나의 아내인 宋福銀, 사랑스런 아들 燦皓, 泰皓, 항상 걱정을 해 주신 어머님, 激勵과 칭찬을 아끼지 않으신 장인어른과 장모님을 비롯하여 여러 친지분들에게도 깊은 감사를 드리며, 지금은 곁에 계시지 않지만 무척 기쁘게 생각하실 아버님 靈前에 이 論文을 바치며 앞으로 이것을 계기로 더욱 더 정진하는 姿勢로 임하고자 합니다.

