(044-053)02강 권 2014.5.16 5:8 PM 페이지 44 001 Free-2438-670-mono

돼지인공수정의 신기술과 현장 적용



강 권 박사
한국유전자서비스 대표

국내에서 인공수정산업의 발전은 양돈농가를 전문화하고 대형화하는 데 큰 역할을 해 왔으며, 양돈산업에서 필수요소로 자리매김하였다. 인공수정 기술의 활용은 국내 양돈산업의 주간관리(Batch system)의 도입 후 활성화되기 시작하였고, 현재는 그룹관리 시스템(Group batch system)의 운영을 하는 데 있어서 더욱 필요한 도구가 되었다. 국내 인공수정산업은 양돈산업의 발전에 여러 가지 장점을 제공하면서 빠른 성장을 이루어왔지만, 최근 들어서는 여러 위기상황과 맞물려서 눈에 띄는 신기술의 개발은 답보상태에 있다고 해도 과언은 아니다.

이 글을 통해서 필자가 직간접으로 관여한 액상정액 관련 국내 연구 개발 사례를 살펴보고, 신기술은 아니지만 신기술처럼 최근에 사용이 증가하고 있는 심부 인공수정과 동결정액에 대하여 기술하고, 아직까지는 양돈산업 현장에서 사용되고 있지는 않으나 지속적인 과제로 연구 개발되고 있는 정자 성분리(Sperm Sexing), 정자캡슐화 연구(Sperm encapsulation) 등을 살펴보고자 한다.

1. 국내 인공수정 현황

국내 돼지인공수정산업은 1955년 중앙축산기술원에서의 암퇘지 10두의 인공수정을 시작으로 적은 규모로 성장을 거듭해 오다가, 1994년 '정액 등 처리업에 대한 허가' 규정에 의해 상업용 인공수정센터 도입으로 전국에 본격적으로 확대 보급되어 현재까지 급속한 발전(농가기준 100% 인공수정 시행)을 이루어 왔다. 2011년 기준 국내 돼지인공수정센터는 64개소가 등록되어 있으며, 현재는 52개의 센터가 정상적으로 운영을 하고 있는 것으로 조사되었다.

(044-053)02장 권 2014.5.16 5:8 PM 페이지45 001Free-2438-670-mono

2. 액상정액 관련 국내 연구 현황 및 심부 인공수정 주입과 동결정액의 사용

가. 국내 연구 요약

● 돼지 액상정액의 보존액, 보존온도 및 기간이 정액성상과 번식성적에 미치는 영향(2002, 김인철 외 3명)

① 연구목적 : BTS, Modena, 그리고 Anrohep 3가지 종류의 보존액에 따른 정액의 활력도와 인공수정 시 수태율에 미치는 영향을 연구

② 실험방법 :

- 45두에서 채취한 정액을 3가지 보존액에 각각 5일간 보존하며 정자의 활력과 pH 변화를 확인하고 각 보존액별로 수태율 및 산자수 분석

- 보존온도에 따라 인공수정 시 수태율에 미치는 영향을 분석

③ 결과 : 돼지의 보존액 종류에 따라 Androhep은 보관 3일째부터, BTS와 Modena는 보관 5일째부터 활력이 감소하며, pH는 6.24~7.06 범위에서 규칙적인 변이를 나타냄.

보존액별로 분만율이 보관 5일차의 Modena가 더욱 우수하였으며, Androhep의 경우 보관 3일차부터 산자수가 유의적으로 감소함.

5℃와 17℃에서 보관하였을 경우, 비슷한 산자수를 얻을 수 있었지만, 5℃에서 보관한 것은 보관 4일차부터 산자수 감소경향이 나타남.

● 돼지 액상정액의 보관일수에 따른 오염정도가 체외 수정란 생산효율에 미치는 영향(2006, 김연수 외 5명)

① 연구목적 : 돼지 액상정액의 보관일수에 따른 세균수의 변화를 조사하고 체외 수정란 생산효율을 연구

② 실험방법 :

- 12두에서 채취한 정액을 17℃에서 각각 1일, 3일, 그리고 5일간 보존하며 정자의 활력과 세균수의 변화를 확인

- 체외 수정을 통하여 생산한 수정란의 배 발달을 관찰

③ 결과 : 돼지 액상정액은 보관 3일째부터 정자의 활력 감소와 체외 수정률이 저하되는 경향이 관찰되었기 때문에, 항상제가 포함되지 않은 액상정액의 경우 3일 이상 보관 사용을 하지 않는 것을 권장함.

● 보존기간이 돼지 액상정액의 운동역학 및 수정능 획득에 미치는 영향(2008, 박유진 외 5명)

① 연구목적 : 현재 가장 많이 사용되고 있는 희석액(BTS, Beltsville Thawing Solution)을 이용하여 5일간 정액을 보존하였을 때 정자의 운동역학 및 수정능 획득능력의 변화과정을 연구

② 실험방법 :

(044-053)02장 권 2014.5.16 5:8 PM 페이지46 001 Free-2438-670-mono

- 37두에서 채취한 정액을 5일간 17℃에서 보관하여 보관 1일, 3일, 4일, 그리고 5일차 별로 분석
- CASA(Computer assist sperm analysis)를 이용하여 정자의 운동역학을 분석
- CTC(Chlorotetracycline) 형광물질을 이용하여 정자의 수정능력 획득 및 첨체반응의 변화 분석

③ 결과 : 돼지의 액상정액의 보존기간이 증가할수록 정자의 운동역학 지표 중 정자의 운동성과 LIN(선형도)는 감소하였지만, 보존기간 3일 이내에서는 정자의 전진 운동성 지표와 첨체막의 변화가 없었으므로 이 기간 내에 인공수정을 권장함.

● 돼지 액상정액 보존일수에 따른 정액 내 세균과 정자 기능변화(2012, 정기화 외 1명)

① 연구목적 : 돼지정액의 보존일수에 따른 세균의 증식정도를 조사, 그리고 정자의 기능에 미치는 영향을 구명하여 돼지 액상정액의 적정 보존일수에 대한 연구

② 실험방법 :

- 채취한 액상정액을 BTS를 보존액으로 하여 7일간 17℃ 보관
- 원심 분리한 농축정액을 37℃ 호기성 조건으로 24시간 배양하여 총 세균수 측정
- CASA(Computer assist sperm analysis)를 이용하여 정자의 운동성 측정
- 보존기간 동안 정자의 생존율, 기형률, 첨체반응을 조사

③ 결과 : 희석정액의 세균수는 보관 3일차부터 유의적으로 증가하였고, 정자의 생존율을 보관 5일차부터 유의적으로 저하되는 것으로 확인

그래서 항생제를 첨가하지 않은 정액은 보관 3일째부터 세균의 영향을 받기 시작하므로 가능한 빠른 시간 내에 희석정액을 이용하여야 수태율 증진에 도움을 줄 것임.

나. 심부 인공수정과 동결정액의 사용

1) 심부 인공수정

돼지인공수정에는 3가지 방식이 있는데, 정액을 어느 곳에 주입하는가에 따라 아래와 같이 3가지로 나눌 수 있다(그림 1).

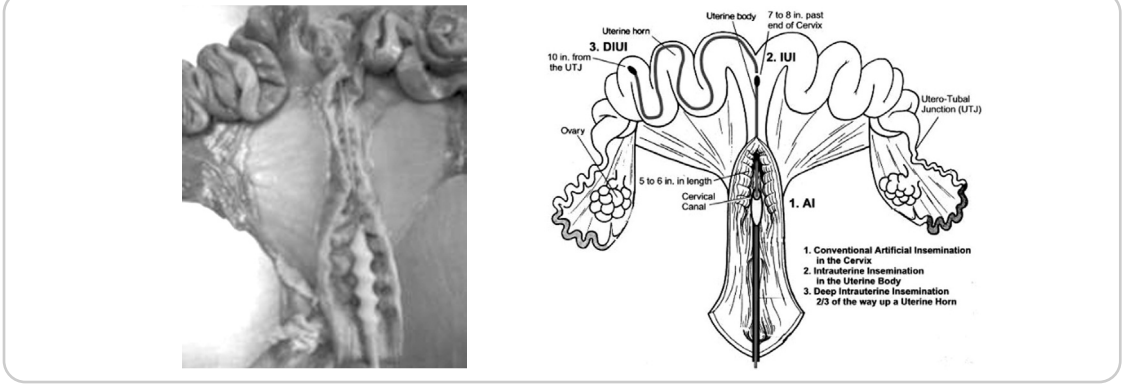
① 전통적 방식의 인공수정으로(Artificial Insemination, 이하 AI) 정액을 자궁경에 주입

② 정액을 자궁체에 주입(Intrauterine Insemination, IUI 혹은 Postcervical Insemination, 이하 PC-AI)

③ 정액을 자궁각 상단 2/3지점까지 주입(Deep Intrauterine Insemination, 이하 DIUI),

일반적으로 돼지 자궁경은 15~25cm, 자궁체는 6~20cm, 자궁각은 80~130cm, 난관은 15~30cm로 알려져 있는데, 심부 주입을 통한 인공수정을 고려하는 농가는 주입기의 내부관이 80cm 이하의 것을(주입기를 자궁경에 밀착한 후 내부관을 끝까지 삽입하였을 때 주입기 선단에

(044-053)02장 권 2014.5.16 5:8 PM 페이지 47 001 Free-2438-670-mono



(그림 1) 돼지 자궁 및 모식도

서 약 15~20cm에서 정도 카데터가 나오는 주입기) 사용하여 자궁체까지만 카데터를 삽입하여 사용하는 것이 발생 가능한 오염을 그나마 최소화할 수 있다.

심부주입 인공수정은 경산돈을 위주로 적용하고, 초산돈은 가급적 일반 인공수정을 권한다. 굳이 실시해야 한다면, 초산돈 전용 심부주입기를 사용하여야 하며, 성성숙 후 발정이 3번 정도 지난 발정증상이 확실한 개체에 대해서 조심스럽게 적용해 보길 권한다. 산차가 낮을수록 자궁경이 열리는 시간이 길어진다. 따라서 심부주입 인공수정에서의 핵심은 외부 주입기를 자궁경에 밀착 후 내부 카데터를 삽입하기 앞서 자궁경이 열릴 때까지 기다리는 것이 매우 중요하다. 절대 무리해서 내부 카데터를 삽입해서는 안 된다. 경산돈의 경우 외부 주입기를 자궁경에 밀착 후 2분 안에 대부분 자궁경이 열리고, 초산돈의 경우 5분 이상이 걸리는 개체도 있다.

심부주입 인공수정을 적용하고자 하는 주목적이 정자수 및 정액량을 줄이기 위함이 돼서는 안 되고, 수태율 및 산자수가 무조건 증가한다고 생각해서도 안 된다. 심부주입 인공수정은 발정이 가장 잘 오는 모돈에게 적용해 보거나, 계산 착오로 갑작스레 수정시켜야 할 모돈은 많은데, 정액이 부족할 경우에 적용해 볼 수도 있다. 또한 대형 농장일수록 인공수정에 소요되는 시간이 길어지기 때문에 심부주입 인공수정을 통해 시간을 단축하여, 그 절약된 시간을 다른 쪽의 사양관리에 이용할 수 있다. 그러나 심부 인공수정을 실시한 후 수태율 및 산자수에 대한 결과는 농장마다, 환경에 따라 성적에 변이가 크게 나타난다는 것을 명심하여야 한다. 반드시 심부 인공수정을 할 때도 주입적기에 정액을 주입하여야 하며, 불량난자를 생산, 보유하고 있거나 자궁의 완전한 회복이 이루어지지 않은 모돈(사진 1 참조)에게는 심부 인공수정을 시행하여 기대할 수 있는 효과를 누릴 수 없음을 명심해야 한다.

2) 동결정액의 사용

돼지 정액의 보관방법으로는 액상 희석정액과 동결정액 두 가지로 구분이 된다. 희석정액은 돼지에서 채취한 정액에서 보존성을 향상시키기 위한 첨가제를 추가하여 인공수정에 활용 가능한 적정 농도로 희석하는 방법으로 현재 인공수정산업에서 가장 많이 사용하고 있으며, 생산절차

(044-053)02장 권 2014.5.16 5:8 PM 페이지48 001 Free-2438-670-mono

교배하여 수정은 되어도…



(사진 1) 자궁 회복이 안 된 불량 모돈

가 간단하며, 대량 생산에 용이하다는 장점을 가지고 있지만, 주로 보관 운반 온도인 15℃~20℃에서는 장기간 보존에는 어려움을 가지고 있다.

정자의 동결보존법은 동결과정 중 돼지의 정자가 온도에 민감하고, 저온 충격으로 60% 이상의 정자가 동결과정 중 사멸하거나 전해질 대사에 심각한 변화가 생기며, 정자막의 손상이 발생한다. 즉 세포의 구조적 변형으로 세포 내의 빙정 형성, 동결에 의한 세포 내 수분이 세포외로 유출되어 세포의 수축현상으로 인한 손상 등을 들 수 있다. 이러한 이유로 액상정액을 이용했을 때보다 수태율과 산자수가 떨어지고, 현장에서 사용하기에 많은 시간과 비용이 소요되었다.

영국의 Polge 등이 1948년에 글리세롤의 동해방지 효과를 발견한 이래 급속하게 진보되었다. 최근에 만들어지는 동결정액은 돼지 정액을 기존의 내동성을 잘 유지시키는 동해방지제(1.5% OEP, Nova Chem, USA)와 해동기계 등의 발달과 정액동결 시 예비 동결과정의 온도, 동결속도 등의 연구로 단점들이 조금씩 극복이 되어 그 사용량이 늘어가고 있으며, 수태율을 비롯한 번식성적도 향상되고 있다. 액체질소에 장기간 보존하는 방법으로 우수한 유전형질을 가진 종돈의 정액을 장기간 보존할 수 있다는 장점을 가지고 있다.

또한 최근에 국내 양돈농가에 동결정액의 사용량이 늘어나는 이유에는 생돈 도입에 따른 질병 유입에 대한 차단 효과 기대와 외국 종돈장 Semen Bank에 보관 중인 우수한 개체의 도입이 저





돼지 동결정액 보관
(영하 196℃ 액체질소 컨테이너)

(사진 2) 동결정액의 보관장면

(044-053)02장 권 2014.5.16 5:8 PM 페이지 49 001 Free-2438-670-mono

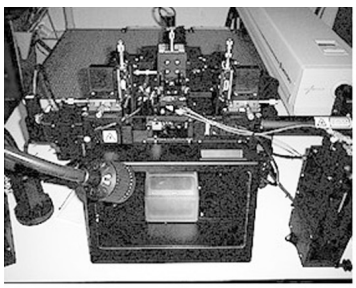
렴하게 이용할 수 있다는 기대감에 있다고 할 수 있다.

반면에 액체질소를 이용하여 보관 및 운반을 해야 하는 어려움과 해동과정의 번잡스러움, 동결해동한 정자의 활력감퇴로 인한 수태율 저하를 초래하는 단점은 여전히 가지고 있다.

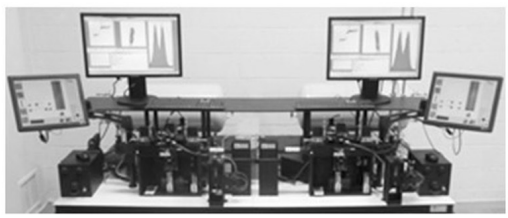
3. 현장에서 활용하기 위해 최근에 시도되고 있는 연구 과제들

가. 정자 성분리법(Sperm Sexing)

고품질의 돈육 생산과 수익성 향상을 위한 양돈 현장에서의 많은 노력들이 이루어지고 있는데, 그 중에서 암수 분리사육법과 수컷의 거세 등이 주로 시행이 되고 있다. 자연성비를 살펴보면, 암(4.5) : 수(5.5)의 양상을 주로 나타낸다. 이러한 암수의 성비를 교배단계에서 암컷의 생산을 늘리기 위한 시도로 정자생리를 분석하여 이용한 방법들이 연구되어지고 있다. 이와 관련된 100개 이상의 정자 성분리 특허가 검색되고 있다. 1891년도에 성염색체의 발견 후 1900년에 멘델의 유전법칙이 발견되었고, 이후 1980년대에 이르기까지 X- Y- 정자의 체적, 사이즈, 운동속도, 정자세포막 전이 차, pH, 특정 protein에 의한 정자 성분리 시도가 있었고 flowcytometer를 이용하는 실질적인 정자 성분리 방법이 등장하였다.



▲ MoFlo-SX



▲ MoFlo-XDP-SX-Dual Head



▲ Epic Altra



▲ Facs Aria

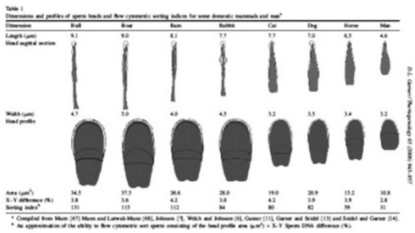
(사진 3) Flowcytometer 장비의 발달

(044-053)02광 권 2014.5.16 5:8 PM 페이지50 001Free-2438-670-mono

DNA 함량 차이를 이용한 정자 성분리

- 정자의 DNA content을 flowcytometer로 처음 측정한 사람 – Pinkel (1982)
- OSU & LLNL이 협동으로 X-와 Y- 정자 집단을 구별하는 데 flowcytometer의 이용 가능성을 보고(Gledhill, 1982)
- LLNL에서 정자 sorting 방법을 발전시켜 처음으로 쥐 정자의 성분리 성공(Pinkel 1982, Science)
- 소, 양, 돼지, 토끼 정자의 DNA 함량 차이를 DAPI 형광 염색을 통해 규명(Garner et al, 1983)
- 최초로 성분리 된 토끼 정자를 난관에 이식해 81% 수컷과 94% 암컷 생산 – Johnson (USDA, 1989)
- USDA의 Beltsville Sperm Sexing 방법을 특허등록(Inventor : Johnson, LA, 1991)

포유동물의 정자 체적 및 DNA 함량차이

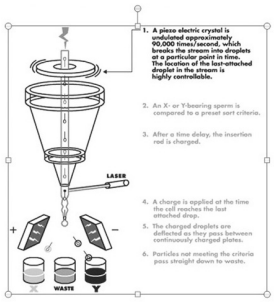


포유동물의 정자 체적 및 DNA 함량차이

Species	DNA content (X-Y difference)	Dimension (μM) Length / Width
Bull	3.8 %	9.1 / 4.7
Boar	3.6 %	9.0 / 5.0
Ram	4.2 %	8.1 / 4.0
Chinchilla	7.5 %	7.7 / 4.5
Dog	3.9 %	7.0 / 3.5
Horse	3.7 %	6.5 / 3.4
Man	2.8 %	4.6 / 10.8

Adopted by Mann and Lutwak-Mann (1981); Johnson (2000); Garner and Seidel (2003).

정자 성 분리 모식도

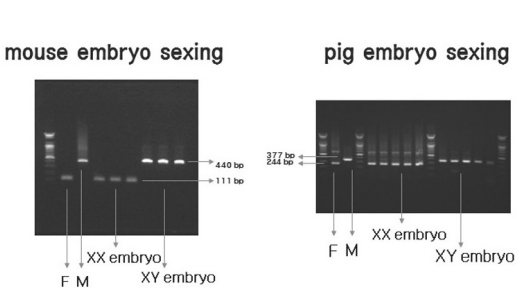


DNA content difference

Species	(%)
Cattle	3.8
pig	3.6
mouse	3.0
ram	4.2



성 분리 정확도 검증 (PCR)



현재 국내에서도 (주)노아바이오텍(손중호 박사)의 주도로 현장에서 적용할 수 있는 암수 분리 방법의 연구가 진행 중에 있다.

정자 성분리 산업화를 위한 극복해야 할 과제가 있다.

(044-053)02장 권 2014.5.16 5:8 PM 페이지51 001Free-2438-670-mono

- 미 경산우 평균 수태율 44%(n=16,587, 2.1×10^6 sperm)
  (DeJarnette et al., 2007)
- 동결 정액 Texas California → AI → 수태율
  (미 경산우 57% vs 경산 39%)
- 일반적으로 수태율은 미경산우 > 경산우

성분리 정액이 일반정액에 비해 10~20% 저조하게 나타남.

현재까지 전 세계적으로 성분리 정자로 태어난 산자수가 2백만 마리가 넘고 유산, 사산, 기형률은 일반 정자와 차이가 없어 분리과정 중의 물리적 스트레스와 DNA 염색에 의한 유전적 결함은 무시할 정도의 수준으로 판단되고 있다.

나. 정자 캡슐화(Sperm encapsulation)

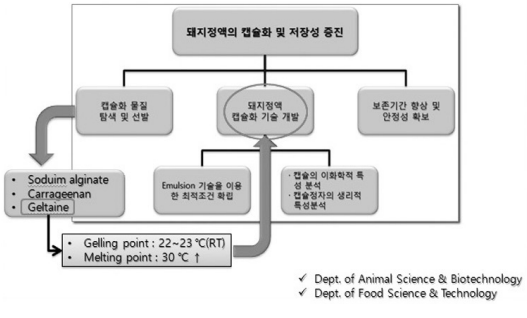
현재 국내에서 가장 많이 사용되고 있는 액상 희석정액의 단점인 보존기간을 증진하며, 동시에 수태율을 향상시키고자 하는 방법으로 돼지 정자의 캡슐화가 연구 진행되고 있다. 그 동안에도 돼지 정자를 장기간 유지 및 보관시키기 위해 보존액의 종류, 돼지 정자의 농도, 배양기간에 따른 정자의 활력, 수태율 등을 연구해 왔으나, 돼지 정자를 장기간 보존하기 위한 기술적 연구는 동결정액 방법 외에는 매우 미진한 편이었다.

정액유통의 대부분을 차지하는 액상 희석정액은 17℃ 보존조건에서 보존 3일째부터(희석제와 보관상태에 따라 다르기는 하지만) 운동성이 일부 저하되고, 응집현상이 증가되는 것을 관찰해 볼 수 있다. 또한 심한 경우에는 첨체변화가 발생하여 수정능력 획득에 문제가 발생되어 수태율을 저하시키는 하나의 원인으로 작용하기도 한다. 이러한 현상들을 우려한 양돈농가들과 일부 기술투자의 어려움이 있는 센타들은 교배에 임박하여 바로 채취, 가공하는 방법을 사용하고 있다. 이로 인해서 양돈농가들은 사용하고자 하는 정액에 대한 충분한 검증의 시간(정액 품질검사) 없이 교배에 활용하는 실정이다. 또한 이러한 보존성에 대한 우려를 많이 가지는 농가에서는 정액을 자주 구입하여 쓰는 경향이 주를 이루고 있어, 이것은 상업적 센터들의 불필요한 유통비용을 상승시켜서 원가 상승의 원인이 된다. 게다가 더 우려되는 점은 금년같이 각종 질병에 시달리고 있는 양돈농가들에게 잦은 정액의 유통은 차단방역의 문제점을 드러내게 된다는 점이다. 팩 같은 용기에 담겨져 유통되는 정액 자체로 인한 질병의 전파위험보다 정액을 운송하는 차량이나 사람에 의해서 질병 전파의 위험이 크기 때문에 그러하다.

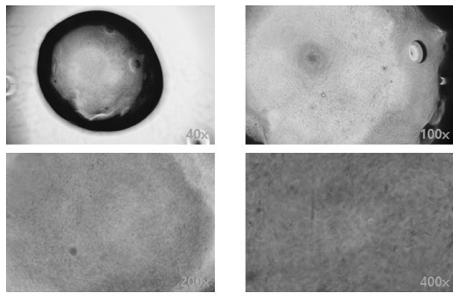
바로 이런 왜곡된 현상들을 풀어가기 위한 방편으로 정자의 캡슐화가 연구 진행 중이다. 정자의 캡슐화는 1985년에 Nobel에 의해 시도되었으며, 최근 들어 Faustini와 Torre에 의해서 돼지 정액의 캡슐화 기술이 더욱더 진보되었고, 산업화 적용을 위한 인공수정 시도, 그리고 FACS 기술을 이용한 정자의 성비분리 후 캡슐화 등의 다양한 방향으로 연구가 진행되고 있다(Torre *et al.* 2007).

(044-053)02장 권 2014.5.16 5:8 PM 페이지52 001 Free-2438-670-mono

Experiment design



Sperm encapsulation



생성된 캡슐 내 정자의 분포현황

국내에서도 2013년부터 정자 캡슐화의 연구가 충남대학교 산학협력단과 필자가 운영 중인 한국유전자서비스와 산학협력사업으로 진행되고 있다.

다. 이 밖에도 정자를 건조시켜 보관하여 필요할 때 사용하는 방법인 dry semen 등도 연구가 진행 중에 있다.

◇--◇--◇--◇

최근 국내 양돈산업에서는 구제역(FMD)와 돼지유행성설사병(PED), FTA, 국가 경제의 어려움 등으로 다소 위축이 되었지만 생산성 향상(MSY 향상), 가축개량 촉진(등지방두께, 출하일령 단축, 사료효율 증가) 등의 이유로 그 어느 때보다도 인공수정에 대한 관심은 많은 편이다. 그러나 관심만 있을 뿐 양돈산업 전반에 있어서 펼쳐지는 신규 사업과 정책, 지원 등이 직접 돼지를 생산하는 양돈농가 수혜 위주로 구성이 되고 있는 것을 알 수 있다. 이런 환경에서 돼지 인공수정산업은 센터 운영 비용 마련에 급급하여 신기술을 연구개발할 자금 확보와 우수 인력을 확보하는 것은 이미 어려운 상황이 되어 버렸다.

양돈농가가 당연히 먼저 살아야 한다는 것은 알지만 양돈산업을 더 발전시키기 위해서는 인공수정산업과 같은 생산 농가에 꼭 필요한 한 부분을 담당하는 산업들과도 같이 공생해 나가야 할 것이다.

MEMO