

韓國家畜繁殖學會誌 26(2) : 119~124 (2002)
Korean J. Animal Reprod.

동결정액 포장방법이 돼지정액의 성상 및 번식성적에 미치는 영향

김인철 · 이장희 · 김현종 · 이성호² · 박창식^{1†}

축산기술연구소

Effect of Packing Materials of Frozen Boar Semen on Sperm Characteristics and Reproductive Performance

Kim, I. C., J. H. Lee, H. J. Kim, S. H. Lee² and C. S. Park^{1†}

National Livestock Research Institute

ABSTRACT

This study was carried out to investigate the effects of packing materials of frozen boar semen to improve reproductive performance efficiency in pig. Boars were raised at Swine Artificial Insemination Center in National Livestock Research Institute, Sunghwan, Chungnam, Korea.

We compared packing protocols for frozen boar semen among 5 ml maxi-straw, 5 ml cryogenic-vial, and aluminum-pack. Cryogenic-vial packing material showed similar sperm characteristics compared with maxi-straw packing material when the sperm was frozen above 15 cm from liquid nitrogen and thawed at 52°C for 190 seconds.

We investigated different thawing times to find out the optimal condition of freezing and thawing protocol with cryogenic-vial. Freezing above 15 cm from liquid nitrogen and thawing at 52°C for 190 seconds were the optimal protocol compared with 120 and 150 seconds. However, normal acrosome rates did not show any differences among thawing times.

Post-thawing results of maxi-straw in water at 52°C for 45 seconds had better total motility and curve linear velocity than those of cryogenic-vial in water 52°C for 190 seconds. However, there were no differences on straightness and normal apical ridge of sperm between maxi-straw and cryogenic vial.

Non-return rate, farrowing rate and litter size of sows inseminated with frozen boar semen of commercial farms were higher in the maxi-straw than cryogenic-vial, but there were no significant differences between maxi-straw and cryogenic-vial. In conclusion, there were no significant differences between maxi-straw and cryogenic-vial and so, we may replace cryogenic-vial packing method instead of maxi-straw packing method by improvement of freezing and thawing rate.

(Key words : Packing materials, Frozen boar semen, Cryogenic vial, Maxi-straw)

[†] Corresponding author : Division of Animal Science and Resources, Chungnam National University, Daejeon 305-764.
Korea. E-mail : Parkcs@cuvic.cnu.ac.kr

¹ 충남대학교 동물자원학부 (Division of Animal Science and Resources, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea)

² 공주대학교 영상보건대학 (College of Visual Image & Health, Kongju National University, Kongju 314-712, Korea)

I. 서 론

돼지 정액의 초저온 (-196°C) 보존이 장기간 보관을 위한 필요한 방법이기는 하나 동결·융해 과정에서 정자의 손상 등으로 인해 번식성적이 기대에 미치지 못하고 있어 실용적으로 사용되기가 어려운 실정이다. 동결정액의 번식성적 개선을 위하여 보존액의 종류, 동결조건, 융해조건, 수정제기 및 포장방법 등이 다양하게 연구되고 있다. 돼지 동결정액이 실용적으로 이용되기 시작한 것은 pellet 동결정액 제조방법 (Pursel과 Johnson, 1975)과 maxi-straw 동결정액 제조방법 (Westendorf, 1975)이 개발되면서부터이다. Johnson (1985)은 pellet 와 5 ml maxi-straw 동결정액을 이용하여 인공수정한 결과 번식성적은 차이가 없다고 보고하였다. Maxi-straw 방법은 온도의 변화가 크기 때문에 동결속도를 급속하게 하는 목적을 달성할 수 없었다고 하였으며 (Fiser와 Langford, 1980), Weitze 등 (1987)은 maxi-straw 포장 동결정액의 경우 straw 의 중앙부보다 외벽쪽이 3.75배나 빨리 동결되기 때문에 내경이 작은 straw에 비하여 생존율이 현저히 낮다고 보고하였다. Weitze 등 (1988)은 표면적이 넓은 포장방법을 이용하면 냉각 속도를 조절할 수 있다고 하였으며, 이러한 것은 포장지 내에서 온도 범위의 최소화와 냉각속도를 조절할 수 있다고 하였다 (Fiser와 Fairfull, 1990). 그래서 2 ml flat straw (Weitze 등, 1988; Ewert, 1988)나 5 ml plastic bag (Rodriguez-Martinez 등, 1996)과 같은 새로운 방법이 개발되고 있으나 모두 실용적으로 사용되지 않으며 최근에는 flat plastic package를 이용한 포장방법이 보고되었다 (Eriksson과 Rodriguez-Martinez, 2000).

따라서 본 연구는 기존의 동결재료인 5 ml maxi-straw, 새로운 동결재료인 5 ml cryogenic-vial, 그리고 aluminum-pack을 이용한 동결정액 제조방법이 정액성상과 번식성적에 미치는 영향을 조사하기 위하여 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시돈

본 시험의 공시돈으로는 축산기술연구소 (충남, 성환)에서 사육되고 있는 순종 종모돈 20두 (Landrace 6; Yorkshire 6; Duroc 8)를 이용하였으며 인공수정은 5개 농장의 경산돈 43두를 공시하여 승가허용 확인 후 24시간에 1차, 1차 수정 12시간 후에 2차 수정하였다.

2. 동결정액 제조

- ① 분리 채취된 농후정액을 채취 즉시 등온의 BTS 보존액으로 1 : 1 혼석하여 실험실로 옮겨 22~25°C까지 약 2시간에 걸쳐 서서히 온도를 낮추었다.
- ② 실온에서 15 ml 시험관에 나누어 담은 정액을 300g에서 15분간 원심분리하여 상층액은 버리고 침전된 정자덩어리만 이용하였다.
- ③ 1차 혼석은 lactose-egg yolk extender 동결보존액을 최종 혼석량의 2/3가 되도록 첨가하여 페펫을 이용하여 정자덩어리와 혼합하였다.
- ④ 1차 보존액 혼석 후 정액저온처리장치 (FHK, FA 112, Japan)내에서 5°C가 될 때까지 2시간 동안 냉각한 후, 2차 보존액 1/3분량을 4회로 나누어 15분 간격으로 혼석하였다.
- ⑤ 최종 glycerol 농도는 2.5%, 정자농도는 5.0× $10^9/5$ ml가 되도록 조절하였다.
- ⑥ 정액의 포장은 기본적으로 5 ml maxi-straw (Minitüb, GmbH, Landshut, Germany)를 이용하였으며, straw 내부에 정액을 주입하고 양 끝을 금속 구슬로 봉하였다. 포장방법별 시험을 위해 cryogenic-vial (Corning, Cambridge, MA 02140, USA)과 aluminum-pack (Aldrich, Z18340-7, USA)을 이용하여 정액을 포장하였다.
- ⑦ 포장이 완료된 정액은 2시간 동안 glycerol 평형 후 실험목적에 따라 액체질소 상단 3, 10 및 15cm에서 20분간 수평동결시킨 후 액체질소 내에 침지하여 보관하였다.

- ⑧ 정액의 융해는 80 ml BTS 보존액을 20°C로 조절된 water bath에서 미리 가온 후 융해된 동결정액과 회석하였다.
- ⑨ Maxi-straw는 52°C water bath에서 45초간 융해하여 미리 준비된 BTS보존액과 회석하였으며 cryogenic-vial과 aluminum-pack은 시험 목적에 따라 융해온도와 시간을 각각 달리하여 융해하였다.

3. 동결정액 융해, 검사 및 인공수정

동결정액의 융해는 융해 후 재 회석하는 보존액으로 BTS를 이용하였으며 100 ml 플라스틱병에 80 ml씩 담아서 동결정액 융해 30분전에 25°C water bath에서 미리 온도를 조절하였다. Maxi-straw는 52°C water bath에서 45초간 융해하였으며, cryogenic-vial은 52°C에서 190초간 융해하여 성상검사와 인공수정에 이용하였다. 융해한 동결정액은 15 ml conical tube (Corning, USA)에 5 ml씩 표본을 취하여 37°C water bath에서 30분간 가온한 후 37°C 슬라이드 가온판이 부착된 정자자동분석기 (SAIS : Sperm Analysis Image System, SI-100, Korea)를 이용하여 정자 운동성, 정자의 빠르기 및 직진성을 조사하였으며, 정자의 정상첨체비율은 Pursel과

Johnson (1974)의 방법에 의하여 조사하였다. 인공수정은 5개 농장의 경산돈 43두를 공시하여 승가허용 확인 후 24시간에 1차, 1차 수정 12시간 후에 2차 수정하였다. 시험기간은 1999년 10월부터 2000년 5월까지였다.

4. 통계분석

본 실험의 결과는 SAS통계 (1988) package를 이용하여 분석하였으며, 분산 분석 후 유의성이 나타나는 효과에 대하여 Duncan 다중검정을 실시하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 포장방법별 동결, 융해조건이 정액성상에 미치는 영향

기존의 5 ml maxi-straw를 대체할 수 있는 포장방법을 개선하기 위하여 cryogenic-vial (5 ml, Corning, Cambridge, MA 02140, USA)과 aluminum-pack (Aldrich, Z18340-7, USA)을 이용하여 동결방법에 따른 융해 후 정액의 성상을 조사한 결과는 Table 1과 같다. Cryogenic-vial을 액체질소 상단 3, 10 및 15 cm에서 각각 동결하고 52°C water bath에서 190초간 융해하였을 때 정자운동성은

Table 1. Effects of packing materials and frozen-thawing protocols on motility and normal apical ridge of frozen boar semen

Packing material ¹	Frozen protocol ²	Thawing method	Motility ³ (%)	Normal apical ridge ³ (%)
MS	15	52°C, 45 sec	39.0±1.9 ^a	28.8±2.2 ^{ab}
	3		41.5±1.1 ^a	37.5±1.0 ^a
CV	10	52°C, 190 sec	41.0±1.0 ^a	29.6±0.8 ^{ab}
	15		43.2±0.6 ^a	28.8±0.7 ^{ab}
AP	3	52°C, 15 sec	20.0±1.0 ^b	21.2±1.5 ^b
	10		41.2±3.6 ^a	32.0±1.2 ^{ab}
	15		21.6±1.0 ^b	28.6±2.5 ^{ab}

¹ MS : Maxi-straw, CV : Cryogenic-vial, AP : Aluminum-pack.

² Height above liquid nitrogen (cm).

³ Mean±SE.

^{ab} Different letters in column were significantly different ($P<0.05$).

41.5, 41.0 및 43.2%로 각각 나타나 액체질소 상단 15 cm에서 동결 후 52°C에서 45초간 융해한 maxi-straw (39.0%) 보다 우수하였으나 통계적인 유의 차는 인정되지 않았고 aluminum-pack으로 포장된 정액을 액체질소 상단 10 cm에서 동결하고 52°C에서 15초간 융해하였을 때와 비슷한 정자운동성을 관찰할 수 있었다. 정상두모율 (NAR)은 cryogenic-vial 포장방법으로 액체질소 상단 3 cm에서 동결 후 융해 시 37.5%로 가장 우수하였으나 통계적인 유의차는 인정되지 않았다. 액체질소 10 및 15 cm 상단에서 동결한 cryogenic-vial 포장방법은 15 cm 상단에서 동결된 maxi-straw와 유사한 정상 첨체비율을 나타내었다.

Aluminum-pack 포장방법을 이용하여 액체질소 상단 10 cm에서 동결 후 52°C에서 15초간 융해한 결과 정자운동성 41.2%, 정상첨체비율 32.0%로 비교적 우수한 결과를 보였으나 재질의 특성상 aluminum-pack 포장방법은 내부 액체의 일정한 두께 조절 등의 불편함으로 실용성이 없을 것으로 사료되었다.

이상의 결과로 볼 때 cryogenic-vial도 돼지동결 정액 포장재료로 이용이 가능한 것으로 판단되어 cryogenic-vial 포장방법을 이용하여 적정한 융해온도와 시간에 대하여 추가적으로 조사하였다.

2. Cryogenic-vial 포장방법의 융해조건이 정액 성상에 미치는 영향

포장방법별로 동결, 융해 방법을 달리하여 정액

성상을 조사한 결과 정액성상이 기존의 maxi-straw 와 유사한 것으로 조사된 cryogenic-vial를 이용하여 융해조건을 달리 하였을 때 정자운동성과 정상 첨체비율을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 액체질소 상단 15 cm에서 동결 후 융해조건을 52°C water bath에서 120, 150 및 190초로 각각 달리 하였을 때의 정자운동성은 융해 후 0.5시간에는 차이가 없었으나 융해 2시간 후에는 190초간 융해한 정액이 40.0%로 현저히 높은 정자운동성을 나타내었다 ($P<0.05$). 정상첨체비율은 융해 후 0.5시간에 27.5 ~ 29.2%, 2.0시간에 22.4~25.5%로 나타나 융해시간에 따른 차이는 없는 것으로 조사되어 cryogenic-vial 포장방법을 이용할 경우에는 액체질소 상단 15 cm에서 20분간 동결 후 52°C water bath에서 190초간 융해시 정액성상이 가장 우수한 것으로 조사되었다.

3. 포장방법별 동결정액의 융해 후 정액 성상에 미치는 영향

Cryogenic-vial 포장방법과 maxi-straw포장방법의 정액성상을 비교 조사한 결과는 Table 3과 같다.

총정자운동성 (TM: total motility)과 정자의 빠르기 (VCL : curve linear velocity)는 maxi-straw방법이 54.3과 46.6%로 cryogenic-vial방법의 35.6과 36.6%보다 높았으나 ($P<0.05$), 정자의 직진성 (STR : straightness)과 정상첨체비율은 maxi-straw가 53.2 와 32.6%로 cryogenic-vial의 47.3과 29.8%와 비슷한 경향을 나타내었다.

Table 2. Effects of thawing methods on motility and NAR by cryogenic-vial package of frozen boar semen

Thawing method	Motility ² (%)		NAR ² (%)	
	0.5 h	2.0 h	0.5 h	2.0 h
52°C, 120 sec	38.8±3.80	25.0±3.82 ^b	29.2±3.02	24.4±0.65
52°C, 150 sec	35.5±3.53	23.5±2.79 ^b	28.6±5.00	22.4±1.33
52°C, 190 sec	45.0±0.14	40.0±5.00 ^a	27.5±3.70	25.5±0.50

¹ NAR : normal apical ridge.

² Mean±SE.

^{a,b} Different letters in column were significantly different ($P<0.05$).

Table 3. Effects of different packing methods on frozen boar sperm characteristics after thawing

Packing material	Thawing method	Post-thaw quality of frozen sperm ¹			
		TM ² (%)	VCL ² ($\mu\text{m/s}$)	STR ² (%)	NAR ² (%)
Maxi-straw	52°C, 45 sec	54.3±4.01 ^a	46.6±2.14 ^a	53.2±3.55	32.6±2.77
Cryogenic-vial	52°C, 190 sec	35.6±4.07 ^b	36.6±3.12 ^b	47.3±2.19	29.8±2.19

¹ Mean±SE.² TM : total motility, VCL : curve linear velocity, STR : straightness, NAR : normal apical ridge.^{a,b} Different letters in column were significantly different ($P<0.05$).**Table 4. Fertility results after AI with frozen boar semen packed with maxi-straws and cryogenic-vials**

Packing material	No. of sow	Non-return rate (%)	Farrowing rate (%)	Litter size ¹ (total born), head
Maxi-straw	22	77.3	68.2	8.0±0.69
Cryogenic-vial	21	66.7	61.9	7.4±0.74

¹ Mean±SE.

4. 포장방법이 동결정액의 인공수정시 번식성적 에 미치는 영향

기존의 maxi-straw 포장방법과 cryogenic-vial 포장방법으로 제조된 동결정액의 번식성적을 비교 조사하기 위하여 인공수정 실증시험을 실시한 결과는 Table 4와 같다. Maxi-straw의 수태율과 분만율 및 총산자수는 77.3%, 68.2% 및 8.0두로 조사되어 cryogenic-vial 포장방법의 66.7%, 61.9% 및 7.4 두보다 다소 우수하였으나 통계적인 유의차는 인정되지 않았다.

이상의 결과로 볼 때 기존의 maxi-straw 방법에 비하여 cryogenic-vial 방법이 만족할만한 번식성적을 얻지는 못했으나 정액제조 및 보관의 편리성과 용해시 간편성 및 파손율 감소 등의 이점이 있으므로 동결 및 용해방법에 대한 추가적인 연구가 보완되면 기존의 maxi-straw를 대체할 수 있는 새로운 포장방법의 가능성은 나타내었다고 사료된다.

IV. 적 요

본 연구는 돼지에서 동결정액을 이용한 번식능력을 개선하기 위한 동결정액 포장재료의 효과를

구명하기 위하여 실시하였다. 본 시험에는 축산기술연구소 종축개량부 (충남, 성환)의 인공수정센터에서 사육중인 종모돈이 사용되었다.

기존의 돼지 동결정액 포장방법인 maxi-straw 동결정액 포장방법과 5 ml cryogenic-vial 및 aluminunum-pack 포장방법을 비교한 결과 cryogenic-vial로 포장하여 액체질소 상단 15 cm에서 동결한 후 52°C water bath에서 190초 용해한 방법이 기존의 maxi-straw 방법과 비슷한 결과를 나타내었다. Cyogenic-vial 포장방법의 동결-용해 방법을 설정하기 위하여 용해시간을 달리하여 시험한 결과 액체질소 상단 15 cm에서 동결하고 52°C에서 190초간 용해하였을 때 정자운동성이 120초 및 150초 용해시 보다 우수하였다 ($P<0.05$). 그러나 정상첨체비율은 용해시간 간에 차이가 없었다.

52°C에서 45초간 용해한 maxi-straw 포장방법과 52°C에서 190초 용해한 cryogenic-vial 포장방법간에 정액성상을 비교한 결과 총정자운동성과 정자의 빠르기는 maxi-straw가 우수하였다 ($P<0.05$). 그러나 직진성과 정상첨체비율은 두 포장방법간에 차이가 없었다. 동결정액 포장방법별 인공수정시 번식성적은 maxi-straw 동결정액이 cryogenic-vial

동결정액보다 수태율, 분만율, 그리고 산자수가 높았으나 통계적 유의차는 인정되지 않았다.

이상의 결과를 종합해 보면 cryogenic-vial 포장방법의 동결 및 용해방법을 좀 더 연구개발하면 기존의 maxi-straw 포장방법을 대체하여 실용화 할 수 있을 것으로 사료된다.

V. 인용문헌

1. Eriksson, B. M. and Rodriguez-Martinez, H. 2000. Export of frozen boar semen in a new flat package. 4th Int. Conf. Boar semen preservation. p.244.
2. Ewert, L. 1988. Experiments on preparation of boar spermatozoa for cryoconservation in straws and biological-physical aspects of thawing by microwaves. Thesis. School of Vet. Med., Hannover. p.91.
3. Fiser, P. S. and Langford, G. A. 1980. Effect of pellet size on survival of ram spermatozoa frozen on dry ice. Cryobiology, 17:619.
4. Fiser, P. S. and Fairfull, R. W. 1990. Combined effect of glycerol concentration and cooling velocity on motility and acrosomal integrity of boar spermatozoa frozen in 0.5 ml. straws. Mol. Reprod. Dev., 25:123-129.
5. Johnson, L. A. 1985. Fertility results using frozen boar spermatozoa : 1970 to 1985. 1st Int. Conf. on Deep Freezing of Boar Semen. Swedish Univ. Agric. Sciences, Uppsala. pp.199-222.
6. Pursel, V. G. and Johnson, L. A. 1974. Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. Theriogenology, 1(2):36-68.
7. Pursel, V. G. and Johnson, L. A. 1975. Freezing of boar spermatozoa: Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. J. Anim. Sci., 40:99-102.
8. Rodriguez-Martinez, H., Eriksson, B. and Lundheim, I. 1996. Freezing boar semen in flat plastic bags. Membrane integrity and fertility. In: Rath, D., Johnson, L. A., Weitze, K. F. (Eds.), Boar Semen Preservation III. Proc. 3rd Int. Conf. Deep Freezing Boar Semen. Reprod. Dom. Anim. 31 Blackwell, Berlin. pp.161-168 (Suppl. 1).
9. SAS Institute. 1988. SAS User's Guide : Statistics (version 6.03), SAS Inst., Inc., Cary, NC., USA.
10. Weitze, K. F., Rath, D. and Baron, G. 1987. Neue Aspekte der Tiefgefrierkonservierung von Ebersperma in Plastikröhren. Dtsch. tierztl. Wschr., 94:485-488.
11. Weitze, K. F., Rath, D. and Leps, H. 1988. Influence of volume/surface ratio of plastic packages upon freeze-thaw rate and fertility of boar semen. Proc. 11th Int. Cong. Anim. Reprod. Artif. Insem., Dublin. 3:312.
12. Westendorf, P., Richter, L. and Treu, H. 1975. Zur Tiefgefrierung von Ebersperma. Labor-und Besamungsergebnisse mit dem Hülsnberger Pailletten-Verfahren. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 82:261-267.

(접수일자 : 2002. 3. 25. / 채택일자 : 2002. 4. 20.)