

## 돼지 정액의 간편 동결 방법 확립과 동결 정액의 융해 후 생존성 평가

김성곤<sup>1</sup> · 장현용<sup>1</sup> · 박동헌<sup>1</sup> · 박춘근<sup>1</sup> · 정희태<sup>2</sup> · 김정익<sup>1</sup> · 양부근<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup>강원대학교 동물생명과학대학, <sup>2</sup>강원대학교 수의학부대학

### Establishment of the Convenient Boar Semen Freezing Method and Assessment of Viability in Frozen/Thawed Boar Semen

Seong-Kon Kim<sup>1</sup>, Hyun-Yong Jang<sup>1</sup>, Dong-Heon Park<sup>1</sup>, Chun-Keun Park<sup>1</sup>, Hee-Tae Cheong<sup>2</sup>,  
Choung-Ik Kim<sup>1</sup> and Boo-Keun Yang<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup>College of Animal Life Sciences and <sup>2</sup>School of Veterinary Medicine,  
Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

#### ABSTRACT

This study was conducted to establish a convenient freezing method of boar semen. Boar semen was cooled until 5°C for 3 hrs using cell freezer and loaded into straws. Semen straws were frozen in different steps in styrofoam box filled with LN<sub>2</sub>. Highest sperm viability (54.0%) was obtained by 1-step freezing(holding at 10 cm height from the surface of LN<sub>2</sub> for 10 min). Sperm viability increased by holding at -102°C for 10min (74.0%, P<0.05). In thawing regime, sperm viability was significantly higher in 37°C group than in 52°C group. The sperm characteristics did not differ between 1-step and 3-step. After IVF using frozen-thawed boar semen, developmental rate of embryos to the morula+blastocyst stage was in 1-step freezing group than that of 3-step freezing group (27.5 vs 14.7%, P<0.05). The result shows that the 1-step freezing with holding at -102°C for 10min before plunging into LN<sub>2</sub> is a convenient and easy freezing method for boar semen.

(Key words : Frozen/thawed boar semen, Acrosome intactness, Semen quality, Embryo development)

#### 요 약

본 연구는 돼지정액의 보다 간편하고 손쉽게 동결시킬 수 있는 방법을 확립하기 위하여 수행하였다. 돼지정액은 3시간에 걸쳐 5°C까지 냉각 후 straw에 봉입하고 다양한 방법 및 step에 의해 스티로폼 용기 내에 들어있는 LN<sub>2</sub> 중에서 동결하였다. 정자의 생존성은 LN<sub>2</sub> 표면으로부터 10 cm 위에서 10분간 정지 후 침적할 경우 가장 높게 나타났다(54.0%). Straw를 -102°C에서 10분간 정지시킨 처리구가 여타구보다 높은 생존성이 얻어졌다(74.0%, P<0.05). 융해 방법에 따른 동결정액의 생존성 실험에서는 37°C의 융해구가 52°C 융해구보다 유의적으로 높은 결과를 나타냈다(P<0.05). 1단계 동결 방법과 3단계 동결방법으로 돼지 정액을 동결시킨 결과 정액의 일반적 특성 및 침체의 이상 유무를 평가하는 CTC 검사에서는 커다란 차이가 인정되지 않았다. 동결정액을 이용한 체외수정 결과에서는 상실배기 이상 발육율에서 1-step이 3-step보다 높은 발육율을 나타내었다(27.5 vs 14.7%, P<0.05). 본 실험의 결과 돼지정액 동결 시 -102°C에서 10분간 정지시키는 1단계 동결방법이 간편하면서 유리한 동결 방법으로 활용될 수 있음을 보여준다.

#### 서 론

가축 개량 촉진, 생산성 향상, 우량 종모축의 이용 범위 확대 및 특정 경제형질의 개선 등을 목적으로 가축에서 인공수정이 폭넓게 실시되고 있다. 최근에 돼지의 경우 유전적으로 능력이 우수한 개체를 대량 생산하기 위하여 인공수정 보급률이 급증하고 있다. 교통수단의 발

달과 인공수정을 이용하여 태어난 산자의 능력 및 산자수를 자연교배와 비교했을 때 차이가 없어 인공수정 기술이 더 많이 보급되고 있으나, 내동성이 약한 돼지 정액의 특성 때문에 동결 정액보다는 신선 정액이 인공수정에 많이 이용되고 있다. 그러나 신선 정액의 이용은 체외에서 단기간 보존할 수밖에 없는 한계성이 있어, 동결 정액을 이용한 돼지의 개량의 필요성이 대두되고 있다. 돼지 정액의 체외 보존 한계성을 극복할 수 있는 최

<sup>†</sup> Corresponding author : Phone: +82-33-250-8623, E-mail: bkyang@kangwon.ac.kr

선의 방법은 돼지정액의 동결보존 기술을 향상시키는데 있으며, 손쉽고 간편한 방법으로 돼지 정액을 동결할 수 있는 기술의 개발이 실용화 될 수 있다면 돼지 인공수정 기술은 진보할 수 있을 것으로 기대된다.

돼지 동결정액을 이용한 인공수정은 수태율과 산자수가 자연교미의 성적에 비하여 크게 떨어지며, 돼지정액 동결에 많은 시간과 경비가 소요되기 때문에 실용화가 지연되어 왔다. 또한 돼지 정액은 동결과정 중 저온충격으로 인하여 전해질 대사에 심각한 변화와 정자 막의 손상이 발생하여 정자의 운동성과 생존성을 크게 떨어뜨리고 있다. 이를 극복하기 위하여 최근에는 동결방법 및 동결 정액의 용해과정 중 수태율과 생존성에 미치는 요인에 대한 연구들이 활발히 진행되어 좋은 결과를 얻고 있는 실정이다. 이와 같은 연구 성과로 동결 정액을 이용한 돼지 인공수정 기술은 신선 정액을 이용한 결과와 커다란 차이가 없이 비슷한 결과를 얻고 있다(Eriksson 등, 2002).

본 연구는 돼지 정액을 간편하고 실용적인 방법으로 동결시킬 수 있는 방법을 확립하기 위하여 돼지 정액 동결시 예비동결온도, 동결속도 및 용해방법이 돼지 정자의 일반성상에 미치는 영향을 검토함과 동시에 동결 정액을 이용하여 인공수정을 실시할 경우 수태율에 대한 영향을 간접적으로 검토하기 위하여 동결정액을 이용한 돼지 체외수정란의 체외발육율을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 정액채취

강원도 원주시 원주 A-I center의 중모돈에서 수압법으로 농후정액만을 분리하여 정액을 채취하여 돼지정액 보관고에 옮겨 25℃의 온도를 유지하면서 3시간 이내에 실험실로 운반하여 실험에 이용하였다.

### 동결액 준비

1차 동결액은 11%  $\alpha$ -lactose 용액에 20% 난황을 첨가하여 제조하였고, 2차 동결액은 1차 동결액에 1.5% Orvus Es Paste(OEP ; Nova Chem., USA)와 9% glycerol 을 첨가하여 준비하였다.

### 정액동결

#### 1) 예비동결

모든 처리구별 정액동결방법은 원정액과 희석액(Mulberry III, Belgium)을 1:3으로 희석하여 cell freezer (FHK, Japan)를 이용하여 25℃에서 15℃까지 1시간 동안 냉각시킨 후 원심분리(400×g, 20분, 15℃)시킨 후 상층액을 제거하였고, 그 후 1차 동결액을 첨가하여 정자수가  $1 \times 10^9$  정자/ml이 되도록 조정하였다. 그 후 5℃까지 2시간 동안 냉각시킨 후 2차 동결액을 1차 동결액의 1/2를 첨가, 혼합시킨 후 straw를 제작하여 처리구별로 동결하였다.

#### 2) 처리구별 동결법

- Straw 제작 후 LN<sub>2</sub> 표면에서 5 및 10 cm 위에서 각각 5분과 10분간 정치 후 동결시킨 다음 LN<sub>2</sub> 내로 침적하였다(1-step 방법).
- Straw 제작 후 LN<sub>2</sub> 표면에서 10 및 5 cm 위에서 6, 4분 또는 3, 2분 동안 정치 후 LN<sub>2</sub> 내로 침적하였다(2-step 방법).
- Straw 제작 후 LN<sub>2</sub> 표면에서 17, 10 및 5 cm 위에서 각각 2, 2, 1분 및 4, 4, 2분 정치 후 LN<sub>2</sub> 내로 침적하였다(3-step 방법).

### 온도측정 방법

정자를 동결시키기 위한 냉각온도의 측정은 각각 styrofoam box에 액체질소를 6 cm 채우고 액체질소 위의 온도를 자동온도 측정기(Fluke; USA)를 이용하여 측정하였다.

### 동결정액 용해

동결된 각 정액 straw를 LN<sub>2</sub> 용기에서 수일동안 보관 후 37℃ 및 52℃에서 10초와 45초 동안 용해하여 정액의 일반성상을 검사하였다.

### 동결정액의 용해 후 일반성상 검사

#### 1) 유효정자 검사

Makler Counting Chamber (Sefi-Medical Instruments, Israel)를 이용하여 위상차현미경 하에서 사멸정자, 진자 운동정자, 회전운동정자 등을 조사하고 -20℃에서 20분간 동결시킨 후 용해하여 총 정자수를 계산하여 진진운동 비율을 계산하였다.

#### 2) 기형을 검사

Rose-Bengal 염색방법을 이용하여 정자의 기형율을 측정하였다. 즉, 정자 부유액 50  $\mu$ l를 도말하고, 실온에서 완전건조시킨 후 Rose-Bengal 염색액으로 염색한 후 건조시켜 위상차 현미경( $\times 400$ ) 하에서 기형정자를 관찰하였다.

#### 3) 침체 정상성 검사(Coomassie Brilliant Blue; CBB)

정자 pellet에 3.7% paraformaldehyde 용액을 첨가하여 30분간 고정, 원심분리하여 상층액을 제거한 후, PBS를 첨가하여 혼합시킨 정자 부유액을 slide glass에 도말하고 0.25% Coomassie Brilliant Blue 용액으로 염색한 후 위상차현미경( $\times 400$ ) 하에서 정자 침체부위의 염색 유무를 조사하여, 두부가 푸르게 염색된 정자는 정상, 염색되지 않은 것은 이상정자로 구분하였다.

#### 4) Hypoosmotic Swelling Test (HOST)

Na-citrate·2H<sub>2</sub>O와 fructose가 혼합된 150 mOsm의 저장액을 만든 후 저장액 1 ml에 정자 부유액 100  $\mu$ l를 혼합하여 37℃에서 30분간 배양시킨 후 표본을 제작하여 위상차 현미경 하에서 정자 미부의 굴곡 여부를 관찰하였다. 정자의 원형질막 기능성 검사의 기준은 미부가 감겨 있거나, 나선형으로 감겨 있는 정자는 정자 원형질막의 기능이 손상되지 않은 것으로 판단하였다.

**5) 생존율검사(Hoechst 33258/Propidium Iodide ; H258/PI)**

정자부유액 50  $\mu$ l와 동량의 Hoechst 33258(H258)을 첨가하여 2분 동안 37°C에서 배양시킨 후 Propidium Iodide(PI) 용액 25  $\mu$ l를 첨가하여 혼합시키고 2분 동안 재배양시켰다. 배양 후, 10  $\mu$ l의 정자 부유액에 동량의 DABCO(1,4-Diazabicyclo-[2,2,2 octate)와 혼합시킨 후 표본을 제작하고 형광현미경(Zeiss, Germany)하에서 푸른색 정자(사멸정자)와 붉은색 정자(생존정자)를 관찰하여 생사 유무를 판명하였다.

**6) 수정능 획득 및 침체반응을 검사(Chlortetracycline; CTC)**

정자 부유액 100  $\mu$ l에 H258 12  $\mu$ l를 첨가하여 3분간 실온에서 배양하고, 3% polyvinylprorolidone(PVP)를 첨가하여 1차 염색을 실시한 후 원심분리하여 상층액을 제거하였고, 20 mM Chlortetracycline (CTC)용액으로 30초간 염색하였다. 염색 후 12.5% Paraformaldehyde 용액을 혼합시켜 10  $\mu$ l를 slide glass에 옮기고 동량의 DABCO를 혼합하여 표본을 제작하였다. 제작된 표본은 형광현미경( $\times$ 400) 하에서 정자 두부 전체가 녹색 형광으로 염색된 것은 수정능 획득 및 침체반응이 일어나지 않은 정자(F), 침체부위만 염색된 것은 수정능 획득은 일어났으나 침체반응이 일어나지 않은 정자(B), 염색이 연하거나, 거의 안된 것, 두부 밑 부분이 염색된 것은 침체반응이 일어난 정자(AR)로 판정하였다.

**동결정액을 이용한 체외수정란의 체외발육을 검사**

돼지난자의 체외수정은 최 등(2002)의 방법에 준하여 실시하였다.

체외수정 후 NCSU23 배양액(Peeters 등, 1993)에 2% bovine serum albumin(BSA ; Sigma)을 첨가하여 6~9일 동안 체외배양을 시킨 후 체외발육율을 조사하였다.

**통계처리**

본 실험에서 얻어진 결과에 대한 통계적 분석은 SAS package의 최소 유의차 검정(least significant different test ; LSD test)과 General linear model(GLM)을 이용하여 분석하였고, 처리 평균 간 비교는 Duncan의 다중검정법에 의하여 처리 간 유의차를 검정하였다.

**결 과**

**동결 방법에 따른 정액의 생존성**

Styrofoam box을 이용하여 돼지 정액을 동결시킬 때 동결 방법에 따른 용해 후 정액의 활력에 대한 결과를 Table 1에 요약하였다. Table 1에서 나타난 바와 같이 A 방법, 즉 액체질소 5 cm와 10 cm에서 각각 5분 또는 10분간 정치 후 동결한 1단계 동결법의 정자의 생존율은 각각 13.0, 16.0, 21.0 및 54.0%로서 10 cm 위에서 10분간 정치 후 동결한 방법이 가장 좋게 나타났다( $P<0.05$ ).

Table 1. Effects of freezing methods on viability of frozen/thawed boar semen

Freezing group	Freezing step	Holding height (cm)	Holding time (min)	Viability (Mean% $\pm$ SD)
A	1	10	5	21.0 $\pm$ 4.2 <sup>b</sup>
			10	54.0 $\pm$ 7.4 <sup>a</sup>
		5	5	13.0 $\pm$ 7.6 <sup>b</sup>
			10	16.0 $\pm$ 2.2 <sup>b</sup>
B	2	10	3	30.0 $\pm$ 15.8 <sup>a</sup>
			5	25.8 $\pm$ 10.7 <sup>a</sup>
		10	6	
			5	4
		17	2	
			10	2
C	3	5	1	
			4	
		17	4	
			10	4
	5	2		

\* Holding height from the surface of LN<sub>2</sub>.

<sup>ab</sup> Different superscripts within each freezing groups significantly differ ( $P<0.05$ ).

액체질소 10 및 5 cm 위에서 각각 3, 2분 또는 6, 4분 정치 후 동결한 2단계 동결법 중에는 정액의 용해 후 생존율이 각각 30.0 및 25.8%로 나타났으나 유의적인 차이는 인정되지 않았다(B 방법). 3단계 동결법(C 방법) 중에는 액체질소 위 17, 10, 5 cm 위에서 2, 2, 1분 정치 후 동결한 정액의 용해 후 생존율이 22.0%, 4, 4, 2분간 정치 후 동결한 성적이 33.0%로 나타났으나 유의적인 차이는 인정되지 않았다.

**정치온도와 시간에 따른 생존성**

스티로폼 통을 이용하여 간편하게 1단계 방법으로 돼지정액을 동결할 때 정치온도와 시간이 용해 후 돼지 정자의 생존율에 미치는 영향에 대한 결과를 표 2에 요약하였다. Styrofoam box 내 액체질소 표면 8 cm 상단 (-102°C)에서 10분간 정치 후 동결시킨 처리구의 용해 후 정자의 생존율이 74.0%로서 10 cm(-81°C) 위에서 10분(58.0%)과 15분(48.3%)간 정치 후 동결시킨 처리구와 12 cm(-74°C) 위에서 10분(21.2%)간 및 15 cm(-59°C) 위에서 10분(33.3%)과 15분(38.3%)간 정치시킨 후 동결시킨 처리구보다 유의적으로 높은 결과를 나타냈다( $P<0.05$ ).

**용해온도에 따른 생존성**

돼지동결정액의 용해시 용해온도와 시간이 정자의 생

존율에 미치는 효과를 Table 3에 요약하였다. 동결정액을 37°C에서 10 및 45초 동안 용해한 결과 용해 후 정자의 생존율이 각각 49.5와 71.4%로서 37°C에서 45초간 용해한 정자의 생존율이 유의적으로 높았으며( $P<0.05$ ), 52°C에서 10 및 45초간 용해한 정자의 생존율은 각각 53.5와 7.8%로서 52°C에서 10초간 용해한 것이 유의적으로 높은 성적을 나타냈다( $P<0.05$ ). 한편, 37 및 52°C에서 용해시킨 후 정자의 평균 생존율은 37°C에서 용해한 정액이 60.5%로서 52°C에서 용해한 정액의 생존율(30.7%)보다 유의적으로 높은 성적을 나타냈다( $P<0.05$ ).

### 정액의 일반성상

돼지 정액을 1-step 및 3-step 방법으로 동결 후 용해하여 정액의 일반성상과 저장액에서 정자 원형질막의 기능성 검사 및 침체 정상성 등 수정능에 미치는 정자의 능력 검토한 결과를 그림 1에 나타내었다.

운동성, 유효정자율 및 기형율은 1-step에서 각각 74.5, 64.6 및 16.3%이었으며, 3-step은 72.5, 59.5 및 16.9%로서 처리구별 커다란 차이는 인정되지 않았다. 정자의 침체 정상성(CBB 염색법), 생존율(H258/PI 염색법) 및 HO-ST 양성 반응율은 1-step과 3-step에서 각각 87.1, 74.1, 22.1%와 88.1, 71.9, 21.0%로서 동결 방법에 따른 차이는 인정되지 않았다. 그림 1의 CTC 검사에서 나타난 바와 같이 수정능 획득 및 침체반응이 일어나지 않은 비율(F)은 1 step 및 3-step 동결방법에서 각각 32.3과 34.4%로서 차이가 없었지만, 수정능 획득은 일어났지만 침체반응은 일어나지 않은 비율(B)의 경우 3-step의 성적이 39.7%로

Table 2. Effects of holding temperature and time on viability of frozen/thawed boar semen

Holding temp. (°C)	Holding height (cm)	Holding time (min)	Viability (Mean%±SD)
-102	8	10	74.0±4.2 <sup>a</sup>
-81	10	10	58.0±16.2 <sup>ab</sup>
		15	48.3±10.4 <sup>bc</sup>
-74	12	10	21.2±18.4 <sup>d</sup>
-59	15	10	33.3±7.6 <sup>cd</sup>
		15	38.3±2.9 <sup>bcd</sup>

<sup>a-d</sup> Different superscripts within treatments significantly differ ( $P<0.05$ ).

Table 3. Effect of thawing method on sperm viability of frozen/thawed boar semen

Thawing temp(°C)	Thawing time(sec)	Viability (Mean%±SD)
37	10	49.5±13.8 <sup>b</sup>
	45	71.4±10.4 <sup>a</sup>
	Mean	60.5±15.5 <sup>A</sup>
52	10	53.5±6.4 <sup>a</sup>
	45	7.8±6.9 <sup>b</sup>
	Mean	30.7±32.4 <sup>B</sup>

<sup>ab</sup> Different superscripts within same temperature significantly differ ( $P<0.05$ ).

<sup>A,B</sup> Different superscripts significantly differ ( $P<0.05$ ).

서 1-step(32.5%)보다 유의적으로 높게 나타났으나( $P<0.05$ ), 침체반응이 일어난 비율(AR)에서는 3-step이 25.3%와 1-step이 38.8%로서 3-step이 유의적으로 낮게 나타났다( $P<0.05$ ).

### 체외수정 후 수정란의 발육

1-step과 3-step 방법으로 동결한 돼지정액을 이용한 돼지 체외수정란의 체외발육율에 대한 성적을 Table 4에 요약하였다. 수정란의 분할율은 49.7%와 41.5%로서 1-step이 유의적으로 높은 분할율을 나타내었다( $P<0.05$ ). 상실배까지의 발육율은 1-step에서 21.3%로서 3-step의 10.3%보다 유의적으로 높은 성적을 나타냈으나( $P<0.05$ ), 배반포까지 발육율은 각각 6.3%와 5.9%로서 커다란 차이는 인정되지 않았다.

## 고 찰

돼지정액은 온도에 민감하고, 특히 저온충격으로 60% 이상의 정자가 동결과정 중 사멸하거나 전해질 대사에 심각한 변화가 생기며 정자막의 손상이 발생된다. 즉, 세포의 구조적 변형으로 세포내의 빙정 형성, 동결에 의한 세포내 수분이 세포외로 유출되어 세포의 수축현상으로 인한 손상 등을 들 수 있다(Salisbury 등, 1978). 또한 5°C까지 예비 냉각시킬 때, 정자내 원형질막의 인지질이

Table 4. Effect of different freezing method on the development of IVF embryos after *in vitro* fertilization

Freezing methods	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes cleaved	No. (%) of embryos developed to			Morulae plus blastocysts (%)
			8~16 Cells	Morulae	Blastocysts	
1-step	161	80(49.7) <sup>a</sup>	33(41.3) <sup>b</sup>	17(21.3) <sup>a</sup>	5(6.3)	22(27.5) <sup>a</sup>
3-step	164	68(41.5) <sup>b</sup>	34(50.0) <sup>a</sup>	7(10.3) <sup>b</sup>	4(5.9)	11(16.2) <sup>b</sup>

<sup>ab</sup> Values with different superscripts within same column significantly differ ( $P<0.05$ ).

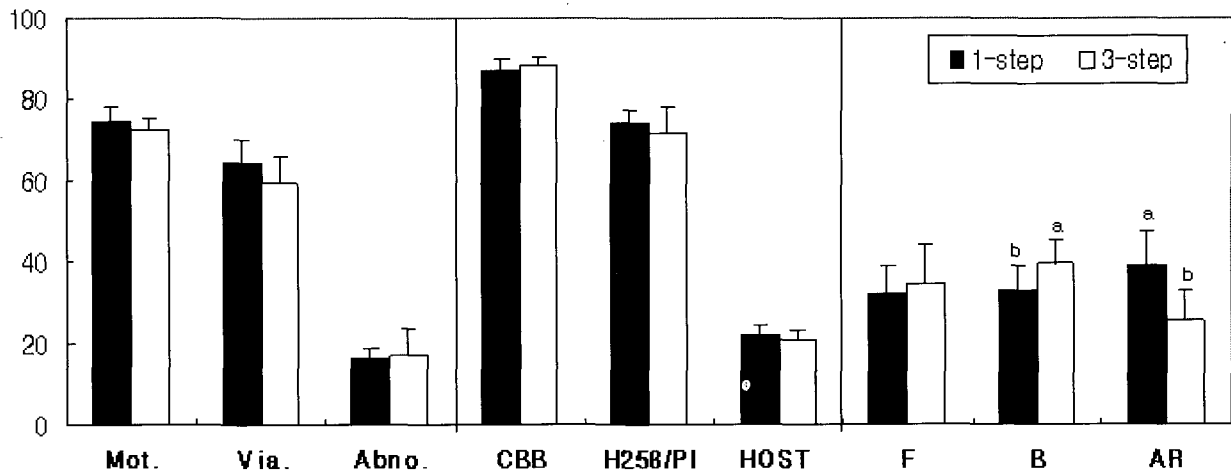


Fig. 1. The analysis of sperm characteristics in different freezing steps. Mot., motility; Via., viability; Abno., abnormality; CBB, Coomassie Brilliant Blue; H258/PI, Hoechst 33258/Propidium Iodide; Host, Hypoosmotic swelling test; F, characteristic of uncapacitated; B, characteristic of capacitated; AR, characteristic of acrosome-reacted sperm; CTC test, Chlortetracycline test.

방출되어 양이온의 흡수나 방출에 방해받게 되고 침체내의 proteinase의 손실을 초래하여 대부분의 정자가 사멸하게 된다(Bwanga, 1991; Maxwell 등, 1997). 그러나 돼지 정자의 동해 원인에 대한 정확한 기작은 아직 정확하게 규명되지 않고 있는 실정이다.

돼지 정액의 동결은 빙점이 형성되기 전인  $-5^{\circ}\text{C}$ 까지 분당  $3\sim 5^{\circ}\text{C}$ 의 냉각속도가 좋으며 빙점이 형성된 후인  $-5^{\circ}\text{C}\sim -50^{\circ}\text{C}$ 까지는 분당  $20^{\circ}\text{C}\sim 50^{\circ}\text{C}$ 의 빠른 냉각속도가 정자의 생존율에 유익하다(Fiser와 Fairfull, 1990; Bwanga, 1991). 그 이유는 빙점이 형성되기 전에는 생존율에 큰 피해가 없지만 빙점이 형성된 후에는 느린 동결속도가 오히려 정자의 원형질막에 피해를 주기 때문이다. 이 등(1989)은 동결시 정지 온도가  $-90^{\circ}\text{C}\sim -157^{\circ}\text{C}$ , 동결 속도가 분당  $7\sim 38^{\circ}\text{C}$  사이의 경우가 용해 후 정자 운동성과 침체에 가장 적은 영향을 주었다고 보고하였다. 돼지 정액 동결시 정자의 생존율이 급격히 떨어지는 것은 동결 과정 중 급속한 냉각 또는 용해할 경우 정자막의 손상과 운동성 및 기능을 손상시키기 때문에 발생된다(Hammersted 등, 1990; Maxwell 등, 1997; Huang 등, 2002). Almlid 등(1996)은 돼지 정액을 급속동결할 경우 생존율이 50% 이상 떨어지나, 냉각 중 특정 온도역에서 정지시간이 길수록 정자 두부의 원형질막의 기능과 운동성은 증가한다고 보고하였다. 그러나 Kumar 등(2003)은 straw 제작 후 분당  $-1, -30, -50^{\circ}\text{C}$ 로 냉각했을 경우 정자 용해 후 정자의 생존율에는 다소 차이는 인정되었지만 유의적인 차이는 없었다고 보고하였다. 본 실험의 결과 여러 가지 동결방법 중 3단계 동결법보다는 1단계 동결방법이 용해 후 생존율이 양호하였다. 1단계 동결방법 중  $15^{\circ}\text{C}$ 에서 1차 동결액을 첨가시키고, 2시간에 걸쳐 분당  $0.083^{\circ}\text{C}$ 의 냉각속도로 냉각시킨 후,  $5^{\circ}\text{C}$ 에서 straw를 제작하고  $-102^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 정지(분당  $-10.7^{\circ}\text{C}$ 로 냉각) 후 액체질소로 침적하여(1-step) 동결한 처리구의 성적이 74%로 여타 처리구(분당  $-8.6, -7.9, -6.4^{\circ}\text{C}$ )보다 높은 생존율을 얻었다. 본 실험의 결과는 Almlid 등(1996)과 Medrano 등(2002)의 급속동결 방법의 결과와 일치하는 경향을 나타냈다.

정 등(1999)은 5 ml straw의 경우  $20^{\circ}\text{C}, 37^{\circ}\text{C}$  및  $50^{\circ}\text{C}$ 에서 동결정액을 용해하였을 때 생존율은 각각 14.9%, 7.5% 및 26.8%로서  $50^{\circ}\text{C}$ 에서 1분간 용해한 것이 가장 높은 것으로 나타났으며, 加藤 등(1976)은  $80^{\circ}\text{C}$ 의 높은 온도에서 용해할 경우 생존율이 가장 높았다고 보고하였다. 또한 Ahmad(1984)는  $75^{\circ}\text{C}$ 에서 9초간 용해한 정자의 운동성과 생존율이 가장 좋다고 보고하였고, Fiser 등(1986)도 높은 온도에서 용해한 정자의 생존율이 가장 높다고 보고하였다. 그러나 본 실험에서는  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 45초간 용해한 결과가 가장 높은 것으로 나타나, 위의 연구자들의 결과와 상이한 결과를 나타냈다. 이와 같은 결과는 본 실험과 상기 연구자들의 동결방법의 차이에 기인되는 것으로 사료된다.

정액을 동결보존시킬 경우 정자는 원형질막의 손상으로 인해 세포막의 침투성 및 세포질의 형태적 변화를 가져오며, 세포막의 침투성이 증가하고 세포막이 변성되어 운동성 및 생존율이 감소되며, 이와 같은 세포막의 변성은 침체에 이상을 유발시켜 용해 후 생존율과 수정율이 감소하게 된다(Neild 등, 2003). 임 등(1973)은 동결이 정자 두부에 미치는 효과를 조사하였는데, 용해 후 두부가 상해를 입은 정자는 전체 이상정자의 60% 이상을 차지한다고 보고하였으며, 加藤 등(1976)은 동결용해 후 정자의 두부 손상은 20% 정도였다고 보고하였다. 본 실험의 결과 동결정액의 용해 후 동결방법에 따른 정자의 일반적 특성은 커다란 차이를 나타내지 않았으며, 침체의 손상은 3-step 방법이 유의적으로 높게 나타났다.

돼지 체외수정 및 발육율에 있어서, 동결 정액을 이용할 때 가장 큰 문제점은 액상 정액보다 수정율이 떨어진다는 것이다(Zheng 등, 1992). 이 같은 성적은 냉각과 동결보존이 돼지 정액에 있어서 수정능 획득 및 침체반응을 변화시키는 원인으로 작용하기 때문(Watson, 1996; Maxwell 등, 1997)이라고 추측은 하고 있으며, Cordova 등(1997)은 액상 정액을 이용한 경우가 동결정액에 비해 유의적으로 높은 sperm penetration과 monospermy를 나타냈으며 polyspermy는 차이가 없었다고 보고하였으나, Nagai 등(1988)은 동결 정액과 액상 정액을 이용한

체외수정 실험에서 수정율은 커다란 차이가 없었음을 보고하였다. Almlid 등(1996)은 Flatpack에 보관된 동결 정액을 이용하여 체외 수정을 실시한 경우 투명대 침입율은 증가하였으나 수정율 및 발육율에는 차이가 없었다고 보고하였다. 본 실험의 결과, 1 또는 3-step의 동결방법으로 동결시킨 정액을 사용하여 체외수정을 실시한 결과 분할율과 상실배 이상의 발육된 체외발육 성적은 1-step의 결과가 3-step보다 높은 성적을 나타냈으나, 배반포까지의 발육에는 커다란 차이가 인정되지 않았다. 본 실험의 결과 체외 수정에 이용되는 동결정액은 동결방법에 따라 체외수정란의 체외발육에 다소 영향을 미치는 것으로 나타났다. 본 실험의 결과는 Almlid 등(1996)과 다소 상이한 결과를 나타냈다. 이와 같은 차이는 체외수정과 정자의 동결방법의 차이에 기인되는 것으로 사료된다.

본 실험의 결과를 종합해 보면 돼지 정액 동결 방법은 5°C에서 straw를 제작한 후, -102°C에서 10분간 정지시킨 후 동결 보존하는 1-step 방법이 가장 좋은 것으로 사료된다.

### 인용문헌

- Ahmad K (1984): Effect of thaw rates on survival of buffalo spermatozoa frozen straws. J Dairy Sci 67:1535-1538.
- Almlid T, Hofmo PO (1996): Brief review of frozen semen application under Norwegian AI service conditions. Reprod Dom Anim 31:169-173.
- Bwanga, CO (1991): Cryopreservation of boar semen. I : A literature review. Acta Vet Scand 32: 431-453.
- Cordova A, Ducolomb Y, Jimenez I, Cassas E, Bonilla E, Betrancourt M (1997): *In vitro* fertilizing capacity of frozen-thawed boar semen. Theriogenology 47:1309-1317.
- Eriksson BM, Petersson H, Rodriguez-Martinez H (2002): Field fertility with exported boar semen frozen in the new FlacPack container. Theriogenology 58:1065-1079.
- Fiser PS, Fairfull RW (1990): Combined effect of glycerol concentration and cooling velocity on motility and acrosomal integrity of boar spermatozoa frozen in 0.5 ml straw. Mol Reprod Dev 25:123-129.
- Fiser PS, Rairfull RW, Marcus CJ (1986): The effect of thawing velocity on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa frozen at optimal and suboptimal rates in straws. Cryobiology 23:141-149.
- Hammersted RH, Graham JK, Nolan JP (1990): Cryopreservation of mammalian sperm : What we ask them to survive. J Androl 11:73-88.
- Huang SY, Kuo YH, Lee WC, Tsou HL, Lee YP, Chang HL, Li-Jun Huo JJ, Ma XH, Yang ZM (2002): Assessment of sperm viability, mitochondrial activity, capacitation and acrosome intactness in extended boar semen during long-term storage. Theriogenology 58:1349-1360.
- Kumar S, Millar JD, Waston PF (2003): The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa : A comparison of two controlled-rate cooling machines. Cryobiology 46: 246-253.
- Maxwell WMC, Johnson LA (1997): Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. Theriogenology 45:209-219.
- Medrano A, Watson PF, Holt WV (2002): Importance of cooling rate and animal variability for boar sperm cryopreservation : Insights from the cryomicroscope. Reproduction 123:315-322.
- Nagai T, Takahashi T, Masuda H, Shioyo Y, Kumayama M, Fukushima M, Iwasaki S, Hanada A (1988): *In vitro* fertilization of pig oocytes by frozen boar spermatozoa. J Reprod Fertil 84:585-591.
- Neild DM, Gadella BM, Maria GC, Marcelo H, Miragaya C, Colenbrander B, Agüero A (2003): Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation. Theriogenology 59:1693-1705.
- Salisbury GW, VanDemark NL, Lodge JR (1978): Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle. W. H. Freeman and Co. 2nd (eds), San Francisco, USA.
- Watson PF (1996): Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. In Rath D, Johnson LA and Weitze KF (eds), boar semen preservation III. Proc. 3rd Int. Conf. Boar semen preservation, Mariensee, Germany, August, 1995. Reprod Domest Anim Vol 31 Blackwell, Berlin, pp. 135-140.
- Zheng YS, Fiser P, Sirard MA (1992): The use of ejaculated boar semen after freezing in 2 or 6% glycerol for *in vitro* fertilization of porcine oocytes matured *in vitro*. Theriogenology 38:1065-1075.
- 加藤稔史郎, 井上揚一, 廣野森, 入浴明, 西川義正 (1976): Effect of thawing procedure on motility and acrosome system of frozen boar spermatozoa. 日本凍結精液研究學會報 48:15-19.
- 이광원, 지설하, 손동수, 김학규, 박창식, 김친철, 최진성, 고문석, 정행기, 김현 (1989): 5 ml straw에 보존한 돼지 회색정액의 생존성과 수정능력에 관한 연구. 한국동물자원과학회지 31:158-161.
- 임종우, 윤창현 (1973): 돈정액 보존에 관한 연구. 축산진흥연구소보 1:96-102.
- 정영호, 서경덕, 김광식, 심금섭, 이장희 (1999): 동결 보존한 돼지정액의 융해조건이 정자의 생존율과 침체변화에 미치는 효과. 한국수정란이식학회지 14:131-137.
- 최영진, 박춘근, 정희태, 김정익, 박동현, 장현용, 양부근 (2002): 항산화제와 Growth factors 첨가가 돼지 체외 수정란의 체외발육에 미치는 효과. Korean J Anim Reprod 26:143-151.

(접수일자: 2006. 3. 6 / 채택일자: 2006. 3. 15)