

Assessing the Use of 5 ml Straws in the Cryopreservation of Boar Semen

Beom-Gi Kim¹, Hyung-Bin Ham², Sang-Hyeon Kim², Jung-Ho Son^{1*} and Ki-Hwa Chung^{3*}

¹Noah Biotech Inc, Cheonan 31035, Korea

²Darby Genetics Inc, Anseong 17529, Korea

³Department of Animal Resources Technology, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 52725, Korea

Received December 27, 2019 / Revised January 15, 2020 / Accepted January 16, 2020

The aim of this study was to overcome some of the limiting factors that the maxi cryopreservation straw of 5 ml presents in processing boar semen. Cryopreservation of semen samples was conducted in 0.5 ml and 5.0 ml straws at two freezing rates: -140°C in 8 minutes and 30 seconds (FR-1) and -140°C in 14 minutes (FR-2). The straws were then thawed and the semen parameters were compared by Computer Assisted Sperm Analysis, and sperm morphology and acrosome status were examined by Coomassie blue staining. The effects of different thawing temperatures and durations were also compared, namely 37°C for 115 sec, 50°C for 45 sec, or 70°C for 25 sec. In general, the FR-1 group showed higher ($p < 0.05$) sperm viability and motility than the FR-2 group in the 5.0 ml straws. Compared to other ranges, thawing at 50°C for 45 sec showed the highest sperm viability and motility ($68.4 \pm 3.6\%$ and $69.5 \pm 2.2\%$, $p < 0.05$), suggesting that thawing temperature should be adjusted concurrently with freezing rate. Sperm morphology and acrosome integrity did not significantly differ among the groups ($p > 0.05$). The data obtained in this study suggest that improving the freezing-thawing protocol for one artificial insemination dose straws (5.0 ml) retains the sperm's parameters from 0.5 ml cryopreservation, and is more convenient to handle, which could result in enhanced reproductive performance.

Key words : Boar semen, cryopreservation, freezing rate, max straw, sperm parameters

서 론

세계적으로 돼지 번식에는 액상 정액을 이용한 인공수정 90% 이상 활용되고 있고[19], 이 중에서 95%가 보존 후 3일 미만의 정액을 사용하고 있다[27]. 액상 정액은 보관 및 유통기간이 짧고, 보존 온도는 17°C로 시간적, 공간적 제약이 있다는 단점을 가지고 있다. 돼지의 동결 정액은 pellet 동결 정액 제조법[25] 및 maxi-straw 동결 정액 제조법[31] 등의 개발이 되어 액상 정액이 가지고 있는 제약 없이 용돈의 개량과 유전자원 보존 등에 매우 활용 가치가 높다고 판단되지만, 돼지 정자의 생리적 특성으로 인한 예민한 내동성, 낮은 번식효율(수정율과 산자수 감소), 용해 과정의 문제 및 비용 과다 등의 원인으로 인하여 제한적으로 활용되고 있는 실정이다[18].

돼지 정자의 동결보존을 위한 보존용기 비교 연구에서, 용해 후 정액 품질은 mini straw (0.25 ml)가 maxi (5 ml) straw보다 높다고 하였고[3] 또 다른 연구에 의하면 플라스틱 bag (5

ml)에 동결-용해된 정자들로 수정 후 생식 기도에서 회수된 수정란의 수가 mid straw (2.5 ml)에 보존된 정자로 수정된 것 보다 더 높았다고 하였다[4]. Saravia 등[28]은 Flat Packs 과 0.5 ml straw (각각 2×10^9 정자/ml)를 이용하여 동결된 정자들에 대한 성상을 비교했을 때 Flat Packs에 보존된 정자가 0.5 ml 스트로우 보존된 정자에 비해 용해 후 생존율이 유의하게 높았다고(49.4 ± 1.4 vs 38.2 ± 2.6) 보고하였다. 최근에는 대부분 돼지 동결정액 프로토콜은 0.5 ml (5~6억 정자/straw)을 이용하여 이루어지고 있는데[5, 6, 32, 33], 현장에서 인공수정을 위해 6~10개의 straw를 용해 하는 과정에서 현장 사용자의 불편 때문에 용해 온도 및 시간을 제대로 지키지 않아 정자의 세포막 손상 및 침체손상으로 번식 성적이 액상정액에 비해 저조하게 나타나고 있다고 보고하였다[23].

여러 연구자들이 이를 보완 하고자 인공수정에 필요한 1도스에 해당하는 정자수를 5 ml straw 및 바이알에 넣어 정자를 동결 보존하는 연구[16]가 있었으나 0.5 ml straw에 비해 5 ml straw의 경우 상대적 표면적의 증가로 동결, 용해 후 열 전달이 균일하지 않아 정자의 생존율과 운동성의 저하[24]로 수정율이 낮다고 보고하였다.

또한 알루미늄 재질의 얇은 팩(5~10 ml)을 이용하여 정자를 동결하는 방식이 개발되었고 용해 후 정자 성상도 비교적 양호하였으나[28] 이들 팩을 보관하기 위해서는 고가의 액체질소 저장 용기가 필요할 뿐만 아니라 용해 과정에서 팩의 파손율이 높아 농가 현장 적용성에 있어 현실적이지가 않은 실정

*Corresponding authors

Tel : +82-41-622-6284, Fax : +82-41-622-6285

E-mail : jhson@noahbio.com (Jung-Ho Son)

kchung@gntech.ac.kr (Ki-Hwa Chung)

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

이다.

동결과 용해 과정 중에 정자는 연속적인 물리화학적 변화를 겪게 되며 이로 인해 정자는 손상을 받게 되는데, 가장 근본적인 손상은 -15 ~ -60°C 사이에서 발생하는 세포막 안쪽과 바깥쪽에 존재하는 수분의 결정화에 따른 동해에 기인 한다[14]. 급속동결의 경우는 세포 내 수분의 결정체화가 먼저 이루어지면서 세포손상을 가져오게 되는 반면 완만동결은 세포 바깥쪽의 수분 동결이 먼저 이루어지면서 세포가 탈수를 겪게 됨으로써 손상을 받게 된다. 초기에 Mazur 등[21]이 제안한 2가지 요인 가설(two-factor hypothesis)에서 언급한 것처럼 적절히 동결 속도를 조절함으로써 동해를 최소화하는 것이 돼지정자의 동결보존의 관건이라 하겠다.

동결 속도가 매우 중요한 요소임에 틀림이 없지만 용해 방법(37~70°C, 5~50 sec) 또한 매우 중요 하고 동결된 용기에 따른 최적의 용해 프로토콜 정립이 중요하다[1, 5]. 여러 연구자들이 5 ml 스트로를 이용하여 동결했을 때 최적의 용해온도 및 시간에(35~90°C, 120~6 sec) 대해 다양한 보고를 하였고[9, 11, 26, 31] 거기에 따라 다양한 번식성적이 보고되었다.

그러므로 본 연구는 돼지정자 동결보존에 있어 5 ml straw 사용의 한계성을 극복하기 위하여 프로그램 동결기를 이용하여 완만동결[2]과 급속동결[29]의 방법을 개선하고자 하였고 아울러 5 ml straw 동결속도에 따른 적합한 용해 조건을 찾고자 본 연구를 수행하게 되었다.

재료 및 방법

정액 준비

본 연구의 종돈은 다비 인공수정센터에서 보유하고 있는 듀록 품종 12두를 이용하였다. 채취한 농후 정액을 1:1(v/v) 비율로 희석제(Seminark Gold, Korea)에 희석하여 실험실로 운반하였다. 정액은 SAIS II system (Medical Supply Co., Korea)을 이용하여 정자의 생존율 및 운동성을 분석하여 운동성이 85% 이상으로 양호한 10두의 정자만을 사용하였다. 동일한 개체에서 채취한 정액을 각각 1/2씩 분주하여 0.5 ml 및 5.0 ml straw를 이용한 동결 실험에 제공하였다.

동결 완충액 준비

1차 동결 완충액은 20% Egg Yolk와 11%의 Lactose가 포함되었고, 2차 동결 완충액은 1차 동결 완충액에 9% Glycerol과 0.15% Sodium Lauryl Sulfate를 첨가하여 최종 Glycerol의 농도를 3%가 되게 하였다.

정액 동결

운반된 정액은 17°C로 설정된 정액 보관고에 넣고 평형을 실시하였다(1~2 hr). 평형이 완료된 정액은 50 ml cornical tube에 분주하여 800 g에서 10분간 원심분리 하여 정장을 제

거하였다. 하층부의 정자피는 1차 동결용 완충액으로 정자 수가 1.8×10^9 spermatozoa/ml이 되도록 희석하였고, 5°C에 도달할 때까지 4~6 hr 동안 BOD 인큐베이터에서 예비 냉각을 하였다. 냉각된 정액에 2차 동결용 완충액을 1/2(v:v) 비율로 15분 간격 3회 분할 첨가 하여 최종 정자수가 1.2×10^9 spermatozoa/ml이 되게 하였다. 준비된 정액은 60분간 Glycerol평형을 실시 후 각각 0.5 ml straw (Midi Straw, Minitube, Germany)와 5 ml straw (Macro straw, Minitube, Germany)에 충전하였다. 정액의 동결은 프로그램 동결장치(Ice Cube 14S, Sy-Lab, Austria)를 사용하여 다음과 같이 동결하였다. 급속 동결법(FR-1)은 5°C에서 -120°C까지 분당 -50.1°C 하강, -120°C에서 30초간 정지, -140°C까지 분당 -40°C 하강 시키는 방법으로 총 동결시간이 8분 30초가 소요되었다. 완만동결법(FR-2)은 5°C에서 -80°C까지 분당 -39.8°C 하강, -80°C에서 2분 10초간 정지, -140°C까지 분당 -20°C 하강 시키는 방법으로 총 동결시간이 14분 소요되었다. 각각의 방법으로 동결된 정액은 프로그램 종료 후 즉시 액체질소에 침지 한 후 정자 정상검사를 실시할 때까지 액체질소 통에서 보관하였다.

용해

0.5 ml 스트로우 동결정액은 37°C 항온수조에서 30초간 용해하였다[1, 7]. 5 ml 스트로우 동결정액은 각각 37°C, 50°C 및 70°C로 설정된 항온수조에서 각각 115, 45 및 25초 동안 용해한 후 35°C에 미리 가온된 용해용 완충액(Seminark Gold, Noah Biotech Inc, Korea)과 혼합하여 10분간 추가 용해하였다.

정자 정상검사

동결-용해 정자의 정상은 CASA장비(SAIS II system, Medical Supply Co., Korea)를 이용 하여 분석하였다. 용해된 정액 1.5 ml을 37°C 항온수조에서 추가로 10분간 가온 시키고, 37°C로 예열된 Makler counting chamber (Sefi-Medical, Israel) 위에 정액 10 µl를 떨어뜨린 후 CCD 카메라(Veltek, Korea)가 부착된 광학현미경(Nikon, Japan)에 연결하여 분석하였다.

침체 충실성 및 형태학적(기형) 검사는 Larson, and Miller [20]의 방법을 이용하여 파라포름 알데하이드에 고정된 정자를 Coomassie Blue 염색을 실시한 후 현미경으로 $\times 600$ 배하에 검사하였다.

통계처리

데이터의 처리는 One way 분산분석(ANOVA)를 이용하였고(Sigma Plot ver 11), 처리 그룹간의 평균과 표준오차를 구한 후 유의성은 Duncan의 다중 범위 검정 테스트를(multiple range test) 이용하였다. 처리구 간의 유의성은 $p < 0.05$ 수준에서 실시하였다.

Table 1. Comparison of two different straws on post-thawed sperm parameters

	Midi-Straw ¹	Max-Straw ²
Viability (%)	58.3±3.7 ^a	40.2±3.9 ^b
Motility (%)	63.5±1.7 ^a	4.7±2.4 ^b
Acrosome Integrity(%)	12.9±2.8	4.2±2.1

¹Spermatozoa were cryopreserved in 0.5 ml straws and thawed at 37°C for 30 sec (n=5).

²Spermatozoa were cryopreserved in 5.0 ml straws and thawed at 37°C for 115 sec (n=5).

Freezing rate: 5°C to -80°C: -39.8°C/min --> -80°C: 2 in 10 sec pause --> -140°C: -20°C/min --> plunge to LN₂

^{a,b}Means within a row with different superscripts differ significantly (*p*<0.05).

Data are expressed as Mean±SEM.

결과 및 고찰

정자 동결에 있어 스트로우 용적 차이가 정자 성상에 영향을 주는지 알아보기 위한 실험(Table 1)에서 0.5 ml straw를 사용하는 동결속도와 동일한 동결속도 에서는 0.5 ml straw가 5.0 ml straw보다 유의하게 높은 생존율 및 활력을 나타내었다 (Table 1, *p*<0.05). 이상의 결과에서 5.0 ml straw를 이용한 정액 동결은 0.5 ml straw와 다른 프로토콜을 사용해야 한다는 것을 확인하였다. 이러한 원인은 5.0 ml straw가 0.5 ml straw에 비해서 상대적으로 낮은 열전도율 때문에 동결 과정이 빠른 속도로 진행되어야만 정자세포들에 손상을 막을 수 있다고 생각된다[6, 12, 33]. 또한 일반적으로 스티로폼 박스 내에서 간편 동결을 진행하는 경우는 동결할 straw와 액체질소 사이의 간격 및 동결시간을 조절하는 방법이 확립되지 않아 최적의 조건을 찾고 유지하기가 어렵다. 따라서 이 후 연구에서는 동결 속도와 온도를 정밀하게 조절 가능한 프로그램동결기를 이용하였다.

5 ml straw를 이용한 동결-융해 정자의 운동성 및 성상을 한 결과는 Table 2에 나타내었다. 완만동결인 FR-2군에 비하여 급속동결인 FR-1군의 정자 생존율과 운동성이 높았다. 또한, FR-1군에서는 37°C에서 115초간 융해 했을 때 보다 50°C

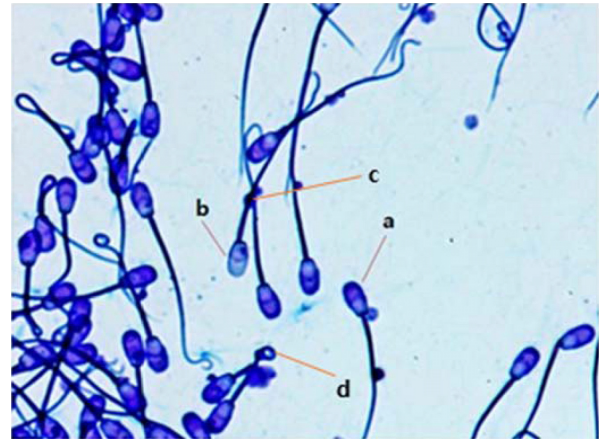


Fig. 1. Frozen-thawed sperm's morphology and acrosome integrity exam. Sperm were stained by Coomassie blue and examined at 600x under light microscope (Carl Zeiss). a. Acrosome intacted; b. Acrosome reacted; c. Tailed sperm; d. Lipid droplet

및 70°C에서 각각 45 및 28초간 융해 하였을 때 생존율과 운동성이 유의하게 높았다(*p*<0.05). 특히 50°C에서 45초간 융해 하였을 때 생존율 및 활력이 68.4±3.6% 와 69.5±2.2%로 가장 높은 경향을 나타냈다. 하지만 첨체충실성은 FR-1군과 FR-2군 및 각 융해 방법에 따른 차이가 없었다(Fig. 1, *p*>0.05). Kim 등[17]은 사람 정자의 경우 짧은 시간 동안 급속동결 하였을 때 동결이 효과적이라 하였으며, 돼지 정액 동결에서는 방법에 따라 다르지만 5°C에서 -150°C까지 5~6분 사이의 동결이 최적 조건이라 하였다[5, 6, 33]. 본 연구에서도 5 ml straw를 이용한 돼지 정자 동결에서 완만 동결보다는 급속동결(8분 30초)이 효과적인 것을 판단된다.

한편, 돼지 정자의 동결에서 동결 속도뿐만 아니라 융해 과정도 중요하여, 융해 과정에서 발생하는 삼투압의 변화 및 활성산소의 발생으로 세포 손상이 발생 할 수 있다고 하였다[15]. 융해방법에 있어서 37°C~70°C 사이의 온도에서 5~50초간 다양한 온도와 시간으로 융해를 보고하였고[1], Fiser 등[13]과 Watson [30]은 낮은 온도보다 높은 온도에서 빠르게 융해하는 방법이 돼지 정자의 경우 융해 후 생존율이 좋다고 하였다.

Table 2. Effects of freezing rate and thawing durations on post-thaw sperms parameters cryopreserved in 5 ml straw

Thawing method	FR-1 ¹			FR-2 ²		
	Viability (%)	Motility (%)	Acrosome integrity (%)	Viability (%)	Motility (%)	Acrosome integrity (%)
37°C/115 sec	55.4±2.8 ^b	60.7±1.6 ^b	11.4±2.2 ^a	54.2±1.5 ^{a,b}	55.3±2.5 ^a	13.1±1.9 ^a
50°C/45 sec	68.4±3.6 ^a	69.5±2.2 ^a	13.6±1.5 ^a	61.4±4.1 ^a	60.3±4.7 ^a	12.9±2.8 ^a
70°C/25 sec	65.8±3.3 ^a	66.6±3.6 ^a	14.3±3.2 ^a	61.2±3.5 ^a	59.1±2.6 ^a	10.6±3.2 ^a

¹Freezing rate to reach -140°C was 8 min and 30 sec.

²Freezing rate to reach -140°C was 14 min.

^{a,b}Means within a column with different superscripts differ significantly (*p*<0.05).

Data are expressed as Mean ± SEM.

Chung 등[8]은 5 ml straw를 20°C, 37°C 및 50°C에서 용해 하였을 때 각각 14.9, 7.5, 및 26.8%의 생존율을 보였으며 50°C에서 1분간 용해 하였을 때 가장 높은 생존율을 보였다고 하였다. 또한, 용해의 시간을 천천히 진행하였을 때 세포 내 얼음의 재결정으로 정자에 손상을 줄 수 있다고 하였다[10, 22]. 본 연구에서도 5 ml straw에 동결된 정자의 경우 37°C의 온도보다 50°C와 70°C에서 용해 하였을 때 보다 높은 생존율과 운동성을 보였으며 동결속도가 더 빠른 FR-1에서 더 높은 성상을 보였고 50°C에서 45초간 용해하였을 때 생존율 및 운동성이 양호 하였다. 이상의 결과를 바탕으로 FR-1 방법으로 동결 후 50°C에서 45초간 용해 하는 것이 5 ml straw를 이용한 돼지 정자의 동결에 가장 유리한 조건이라 판단된다.

본 연구의 결과를 요약하면 동결정액을 이용한 돼지 인공수정에 있어서 1 dose 용 5.0 ml straw를 이용할 때 사용자의 편리성을 제공하고 아울러 동결정액 품질향상을 통한 우수 씨수돼지 유전자원의 효율적인 보존 및 관리가 이루어 질 수 있을 것으로 판단되며, 향후 5.0 ml straw 동결 정액을 이용한 돼지 인공수정에 있어서 용해 후 정자 생존율 및 활력의 지속 시간, 수정적기 판단, 적정 정자 농도 및 정액주입 방법 등에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2018~2019년도 경남과학기술대학교 대학회계 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

1. Abad, M., Garcia, J. C., Sprecher, D. J., Cassar, G., Friendship, R. M., Buhr, M. M. and Kirkwood, R. N. 2007. Effect of insemination-ovulation interval and addition of seminal plasma on sow fertility to insemination of cryopreserved sperm. *Reprod. Domest. Anim.* **42**, 418-422.
2. Behrman, S. J. and Saawads, Y. 1966. Heterologous and homologous inseminations with human semen frozen and stored in a liquid-nitrogen refrigerator. *Fert. Ster.* **17**, 457-466.
3. Bwanga, C. O., de Braganca, M. M., Einarsson, S. and Rodriguez-Martinez, H. 1990. Cryopreservation of boar semen in Mini- and Maxi-straws. *J. Vet. Med. A.* **37**, 651-658.
4. Bwanga, C. O. 1991. Cryopreservation of boar semen. *Acta. Vet. Scand.* **32**, 431-453.
5. Carvajal, G., Cuello, C., Ruiz, M., Vázquez, J. M., Martínez, E. A. and Roca, J. 2004. Effects of centrifugation before freezing on boar sperm cryosurvival. *J. Androl.* **25**, 389-396.
6. Casas, I., Sancho, S., Briz, M., Pinart, E., Bussalleu, E., Yeste, M. and Bonet, S. 2009. Freezability prediction of boar ejaculates assessed by functional sperm parameters and sperm proteins. *Theriogenology* **72**, 930-948.
7. Choi, W. C., Yang, M. H., Lee, Y. S., Cheong, H. T., Yang, B. K., Lee, D. S. C. and Park, H. 2007. Effect of thawing temperature on sperm characteristics of frozen semen in miniature pig. *Reprod. Dev. Biol.* **31**, 175-179.
8. Chung, Y. H., Seo, K. D., Kim, K. K., Shim, K. S. and Lee, J. H. 1999. Effects of thawing conditions on the viability and acrosomal morphology of cryopreserved boar semen, Kor. *J. Emb. Trans.* **14**, 131-137.
9. Corcuera, B. D. 1996. Efecto de la presión osmótica de los diluyentes de la congelación sobre la viabilidad del espermatozoide de verraco. Thesis UCM, School of Biological Sciences, Madrid.
10. Courtens, J. L. and Paquignon, M. 1985. Ultrastructure of fresh, frozen-thawed spermatozoa of the boar. In: Johnson LA, Larsson K (eds), Deep Freezing of boar semen. Swedish Univ. of Agri. Sci. Uppsala. pp. 61-87.
11. Eriksson, B. M. and Rodriguez-Martinez, H. 2000. Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* **63**, 205-220.
12. Estrada, E., Rodríguez-Gil, J. E., Rocha, L. G., Balasch, S., Bonet, S. and Yeste, M. 2014. Supplementing cryopreservation media with reduced glutathione increases fertility and prolificacy of sows inseminated with frozen-thawed boar semen. *Andrology* **2**, 88-99.
13. Fiser, P. S., Pairfull, R. W., Hansen, C., Panich, P. L., Shrestha, J. N. B. and Underhill, L. 1993. The effect of warming velocity on motility and acrosome integrity of boar sperm as influenced by the rate of freezing and glycerol level. *Mol. Reprod. Dev.* **34**, 190-195.
14. Gao, D. and Critser, J. K. 2000. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR J.* **41**, 187-196.
15. Jeulin, C., Soufir, J. C., Weber, P., Laval-Martin, D. and Calvayrac, R. 1989. Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. *Gamete Res.* **24**, 185-196.
16. Kim, C. J., Lee, H., Kim, H. J., Kee, S. H. and Park, C. S. 2002. Effect of packing materials of frozen boar semen on sperm characteristics and reproductive performance. *Kor. J. Ani. Rep.* **26**, 119-124.
17. Kim, E. K., Kim, J. W. and Kim, H. W. 2003. Effect of cryopreservation by slow and rapid freezing on the sperm motility Index, viability and morphology of post-thaw human spermatozoa. *Kor. J. Emb. Trans.* **18**, 43-50.
18. Kim, K. S. and Song, H. B. 2005. Studies on the freezing of boar semen *in vitro* and *in vivo* fertilization capacity of frozen boar spermatozoa. *Kor. J. Emb. Trans.* **20**, 1-8.
19. Knox, R. V. 2016. Artificial insemination in pigs today. *Theriogenology* **85**, 83-93.
20. Larson, J. L. and Miller, D. J. 1999. Simple histochemical stain for acrosomes on sperm from several species. *Mol. Reprod. Dev.* **52**, 445-449.
21. Mazur, P., Leibo, S. P. and Chu, E. H. 1972. A two-factor

- hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. *Exp. Cell Res.* **71**, 345-355.
22. Mazur, P. and Cole, K. W. 1985. Influence of cell concentration on the contribution of unfrozen fraction and salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes. *Cryobiology* **22**, 509-536.
 23. McLaughlin, E. A., Ford, W. C. L. and Hull, M. G. R. 1993. Effects of cryopreservation on the human sperm acrosome and its response to A23187. *J. Reprod. Fertil.* **99**, 71-76.
 24. Pickett, B. W. and Berndtson, W. E. 1974. Preservation of bovine spermatozoa by freezing in straws: a review. *J. Dairy Sci.* **57**, 1287-1301.
 25. Pursel, V. V. 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.
 26. Pursel, V. G. and Park, C. S. 1987. Duration of thawing on post thaw acrosome morphology and motility of boar spermatozoa frozen in 5 ml maxi-straws. *Theriogenology* **28**, 683-690.
 27. Rodríguez-Gil, J. E. and Estrada, E. 2013. Artificial insemination in boar reproduction. In S. Bonet, I. Casas, W. V. Holt, & M. Yeste (Eds.), *Boar reproduction*. pp. 589-608. Berlin: Springer.
 28. Saravia, F., Wallgren, M., Nagy, S., Johannisson, A. and Rodríguez-Martínez, H. 2005. Deep freezing of concentrated boar semen for intra-uterine insemination: effects on sperm viability. *Theriogenology* **63**, 1320-1333.
 29. Sherman, J. 1990. Cryopreservation of human semen, in *Handbook of the Laboratory Diagnosis and Treatment of Infertility*, B. Keel and B. W. Webster, Eds., CRC Press, Boca Raton, Fla, USA. pp. 229.
 30. Watson, P. F. 1990. Artificial insemination and the preservation of semen, In: Lammings G (ed). *Marshall's Physiology of Reproduction vol. 2* Churchill Livingstone, Edinburgh, London, pp.747-869.
 31. 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.
 32. Yeste, M., Estrada, E., Casas, I., Bonet, S. and Rodríguez-Gil, J. E. 2013. Good and bad freezability boar ejaculates differ in the integrity of nucleoprotein structure after freeze-thawing but not in ROS levels. *Theriogenology* **79**, 929-939.
 33. Yeste, M., Rodríguez-Gil, J. E. and Bonet, S. 2017. Artificial insemination with frozen-thawed boar sperm. *Mol. Reprod. Dev.* **84**, 802-813.

초록 : 돼지 정자 동결보존에 있어 5 ml straw의 한계성 극복

김범기¹ · 함형빈² · 김상현² · 손중호^{1*} · 정기화^{3*}

(¹노아바이오텍, ²다비육종, ³경남과학기술대학교 동물소재공학과)

본 연구는 돼지정자의 동결보존에 있어 0.5 ml straw에 비해 5.0 ml straw가 가지고 있었던 제한적인 요소들을 극복하기 위하여 동결속도, 융해온도 및 융해 시간을 확립하기 위하여 실시되었다. 동결속도는 정자가 -140℃까지 도달하는 시간을 8분 30초인 동결법(FR-1)과 14분인 동결법(FR-2)으로 나누어 각각 0.5 ml 및 5 ml straw를 이용하여 동결하였으며, 동결-융해한 정자는 CASA 장비를 이용하여 정자 성상을 비교 분석하였다. 동결속도 만큼 융해온도 및 시간 또한 매우 중요한 요소이기 때문에 융해 방법을 37℃, 50℃ 및 70℃에서 각각 115초, 45초 및 25초간 실시하여 정자 성상을 비교하였다. 그 결과 FR-2의 동결속도 보다 FR-1의 동결속도에서 높은 생존율과 운동성을 보였고, 50℃에서 45초간 융해 하였을 때 가장 높은 생존율과 운동성을 보였다(73.4±3.6; 74.5±2.2%, p<0.05). 정자의 침체 충실성 및 형태학적 특징에서는 처리구간에 유의적인 차이가 없었다. 본 연구를 통해 얻은 데이터를 종합해볼 때, 그 동안 동결정액을 이용한 돼지 인공수정 시 5.0 ml straw가 0.5 ml straw 비해 저조한 정자 생존율 및 활력을 나타냄으로써 번식성적이 떨어져 사용을 기피하여 왔지만 개선된 프로토콜을 활용하면 동결정액을 이용한 돼지 인공수정에 있어 여러 straw를 융해해야 하는 불편함 대신에 인공수정 시 1 straw를(dose) 융해하여 사용함으로써 사용자의 편리성을 높일 뿐만 아니라 인공수정에 있어 집중력을 높여 번식성적 향상에도 기여할 것으로 사료된다.