

돼지 凍結精液의 製造와 利用

任 京 淳

서울大學校

Utilization and Process of Frozen Semen in Boar

Kyung Soon Im

Seoul National University

Summary

Frozen boar semen should be utilized in swine production in order to get its advantages. Much studies were carried out for the practical use of frozen semen. Some of frozen boar semen are used in swine production and some companies are exporting frozen boar semen in U.S.A..

For the practical utilization of frozen semen in swine production in Korea, we have to get deep knowledge and understanding about frozen boar semen and studies on processing and conception of frozen semen.

I. 緒 論

養豚에 있어서 人工授精의 普及의 必要性은 育 種능력에 우수한 種牡豚의 利用率을 확대하여 돼지의 育種능력을 개량한다는 見知에서 重要한 意味를 갖는다. 돼지의 改良을 위해서 人工授精은 液狀精液의 형태로 普及되어 왔는데 1962년을 기점으로한 우리나라의 人工授精 실시누수는 그림 1과 같다. 人工授精의 實施頭數는 1970년까지 증가하다가 1970년 이후 감소하는 경향을 보였으며 반대로

돼지의 飼養頭數는 1970년까지 점차 감소하다가 1970년 이후 계속 증가하는 추세를 보여주고 있다. 1970년 이후 돼지의 飼養頭數가 증가하는 반면 人工授精 實施頭數가 감소하는 原因으로는 첫째는 飼養頭數增加의 主要因이 되는 大規模 企業養豚場에서 人工授精을 기피하여 왔다는 것과 둘째, 液狀精液에 의한 人工授精이 精液의 效率의 輸送 및 保存面에서 어려운점이 있었다는 것을 들 수 있다. 소 特別 芻草에 있어서 凍結精液에 의한 人工授精이 乳을 增加에 功獻한 業績을 생각할 때 養豚에 있어서 凍結精液에 의한 人工授精의 普及은 꼭 實現되어야 할 것이다.

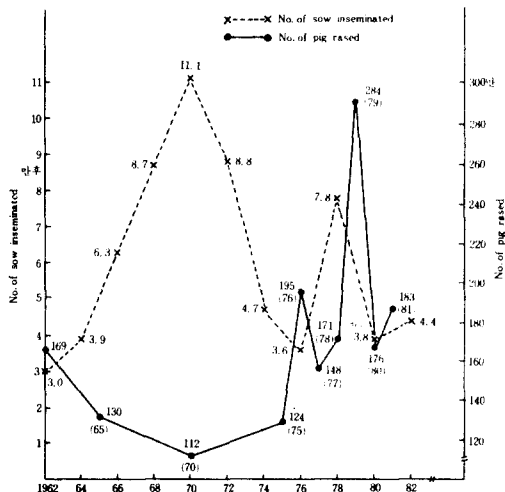


Fig 1. No of sow inseminated and the pig raised during 20years.

II. 凍結精液의 利點

凍結精液의 特性은 精液을 半永久的으로 保存할 수 있고 또 長距離까지 輸送할 수 있는데 있다. 最近 養豚業이 企業化됨에 따라 後代檢定을 필한 種牡豚이 交配用으로 活用되고 있는데 凍結精液을 活用하면 이를 後代檢定 種牡豚의 利用範圍를 擴大할 수 있다. 실제 우리나라에서도 後代檢定을 필한 種牡豚의 凍結精液을 輸入하여 活用하고 있다. 種牡豚을 生畜으로 輸入하거나 自然交配로 쓸 경우는 전염병이 전염될 우려가 있으나 凍結精液을 使用하면 전염병을 豫防할 수 있다. 凍結精液은 長期間保存할 수 있어 種牡豚이 죽은 후에도 精液을 利用하여 仔豚을 생산할 수 있으며 未來를 위하여

遺傳子를 貯藏할 수도 있다. 最近 國立機關과 企業養豚場에서는 自體畜群의 血液更新과 畜群의 遺傳能力을 向上시키기 위하여 種牡豚을 生畜으로 輸入하고 있다. 生畜을 輸入하는 경우는 輸送費를 포함한 제한 經費가 많이 들 뿐만 아니라 輸送중에 生命에 위험부담을 앓고있으며 人殖後에도 환경에 適應하기 까지 注意깊은 飼養管理가 必要하다. 生畜代身 凍結精液으로 輸入하면 精液은 液体窒素保管에 의하여 輸送되므로 작은 經費로 簡便하게 輸送될 수 있다. 凍結精液을 製造하여 輸出하는 world-wide sire, Inc. 에서는 Boar Sire Directory(種牡豚 案内書)를 每年발간하여 養畜家가 원하는 種牡豚을 정액으로 쉽게 선택토록 하고있다. 이 案内書에 수록된 種牡豚은 凍結精液의 製造가 可能한 精液을 生産하는 牡豚이며 어느程度의 受胎率이 얻어질 것이 保誰된 種牡豚일 것이 確實시된다. 輸入한 凍結精液에 의하여 生産된 仔豚은 비록 아버지

가 外國에 飼育된 것이나 出產地의 環境에 쉽게 적응하여 당대에 種畜으로 활용될 수 있게된다. 이와 같은 여러가지 利點을 고려할 때 돼지의 凍結精液은 産業적으로 活用되어야 하며 이를 위하여는 受胎率이 높은 凍結精液 生産에 관한 研究가 必要하다.

III. 凍結精液의 實用化의 障害要因

돼지의 凍結精液 製造에 관한 장기간에 걸친 큰 研究에도 불구하고 지금까지 凍結精液의 實用化에 實效를 얻지 못하고 있는데는 몇가지 要因이 있다. (1) 돼지의 精子는 低溫에 대한 저항성이 약하여 凍結融解후 生存性과 活力이 낮으며 (Table 1) (2) 凍結防止劑로 稀釋液에 Glycerol을 多量으로 添加하였을 때는 液狀 및 凍結融解한 精液의 受胎率이 낮다. (3) 受胎를 위한 1회 注入量이 60-100ml로 다른 家畜에 비하여 많으며 또한 다른 家畜에 比 소는 1회 注入量을 한꺼번에 凍結할 수 있는

Table 1. Sperm survival index of freeze-thawed semen in for diluents (n=5)

	E	S	E+S	T ₂₂
1st diluent	E	S	E+S	T ₂₂
2nd diluent	S	S	S	T ₂₂
Survival	35	41	56	54
Range	30-40	35-50	50-60	50-60

(鄭과 任, 1979)

E: Egg Yolk, S: Skim Milk T₂₂: A. I. Center's diluent

Table 2. Effect of glycerol on conception with liquid semen

level of glycerol(%)	No. A. 1	No of conception	conception rate(%)
0	12	5	41.7
3.5	14	8	57.1
7.0	10	0	0.0

(金 등, 1972)

Table 3. Farrowing results with frozen semen

Glycerol(%)	Female	No. of first inseminations	No of farrowings	% Farrowings	Litter size
2.5	Sows	6	5	71.4	mean 8.4
	Gilts	8	5		Range 3~15
	Total	14	10		
7.5	Sows	8	4	54.5	mean 9.67
	Gilts	3	2		Range 5~14
	Total	11	6		

(King et al., 1966)

나 돼지에서는 한꺼번에凍結할 수 없다. (4) 돼지精子는稀釋, 글리세롤 첨가 및凍結融解에 의하여受精에 관여하는酵素인 Glutamic Oxaloacetic Transaminase (GOT) 등이多量으로漏出하는데 이것이凍結精液의受胎率低下의原因이 되는 것으로示唆된다(그림 2와 3). (5)凍結融解後의 돼지精子의生存性和活力은 돼지의品種, 個體 같은個體에서도每射精에 따라變異가 심하여耐凍性이 강한種牡豚 確保를 위하여는多數의種牡豚이 필요하다. (6)凍結融解의衝擊을 받은精子는頭帽의損傷率이 높으며頭帽의損傷率이 높을 수록受胎率이 떨어진다.

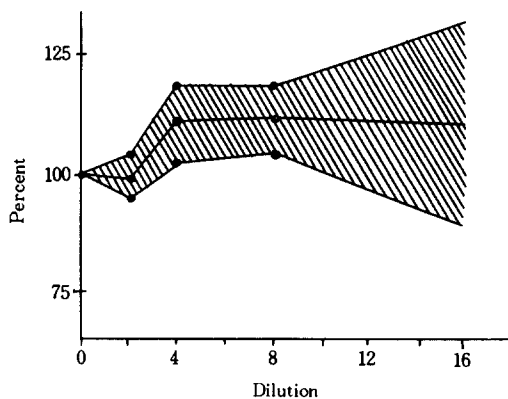


Fig. 2. Changes in boar seminal plasma GOT activity caused by dilution with Tris-tricine semen extender. Undiluted sample equals 100% (Means of six samples and their standard error) (Bower, 1973)

IV. 凍結精液의 歷史

1959年 Hoffman은 -79°C 에凍結保存한 돼지精液을 11두의 암돼지에 수정하여 그중 1頭가受胎하였다고報告하였는데 돼지 동결정액의 最初의受胎例로 간주된다. 1966年 King 등은凍結精液의分娩率이 glycerol 2.5%에서 71.4%, 7.5%에

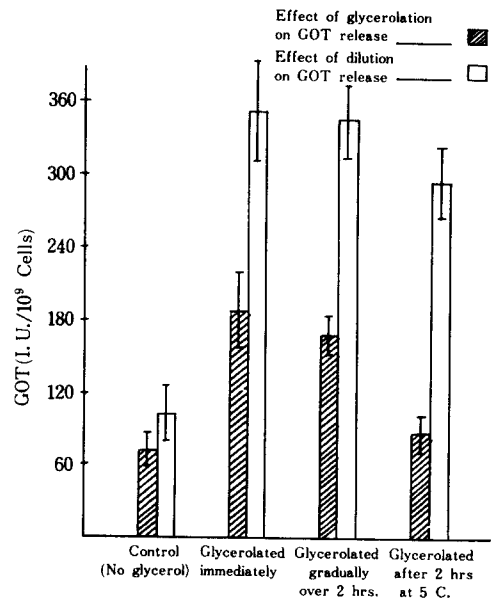


Fig. 3. The effects of method of glycerolation of boar spermatozoa in Tris-tricine extender and subsequent dilution upon GOT release (Means of six ejaculates and their standard error) (Bower, 1973)

Table 4. Acrosomic System of pre and post-frozen spermatozoa in four diluents (n=5)

Acrosome system			Survival (%)	Normal (%)	Lightly Swallowed (%)	Heavily Swallowed (%)	Malformed (%)	Damaged (%)
Diluent								
0.8%	Salt Solution	Pre	86	87	5	2	1	5
		Post	0	6	6	85	2	1
E	E	Pre	84	71	26	1	2	—
		Post	35	27	48	21	2	2
S	S	Pre	86	67	—	5	6	4
		Post	41	25	46	23	3	3
E+S	S	Pre	85	69	23	2	1	5
		Post	56	37	40	19	3	1
T22	T22	Pre	86	61	26	4	1	2
		Post	54	31	44	18	3	4

(Chung & Im, 1979)

서 54.5%로 높은 글리세롤 농도는 受胎에 有害하다는 것을 처음으로 보여주었다. 1969年 和出은 -196°C에 凍結保存한 精液을 6두에 수정하여 4頭가 受胎하였다고 報告하므로써 소의 精液과 같이 돼지 精液도 液體窒素中에서 保存할 수 있음을 보여주었다. 1970年 Polge는 凍結精液을 암돼지의 卵管内에 주입하였을 때 受胎率이 높다는 것을 보여주므로써 凍結精液이 子宮을 거쳐 卵管에 이르는 사이에 受精能力이 상실된다는 것을 示唆해 주었다.

1971年 Crab과 Einarsson, Graham 등, Pursel과 Johnson은 凍結精液을 子宮經管을 통하여 注入하여 受胎成績을 보고하고 있는데 글리세롤의 濃度를 2~3%로 낮추어 使用하고있다. 現在 一部 國家에서 실시하고 있는 凍結精液의 實用化는 Pursel과 Johnson(1975)의 凍結精液의 錠劑化 凍結精液 製造方法에 힘 입은바 크며 Paquignor과 Court(1976) 및 Larsson(1977)에 의한 凍結精液의 製造方法도 現在凍結精液 實用化에 큰힘이 되었다.

Table 5. Histry of forzen boar semen

Author	year	Details	Conception
Hoffman	1959	frozen at -79°C	1/11 heads fertile
King et al	1966	Glycerol 2.5% Glycerol 7.5%	71.4% farming 54.5%
Waide	1969	frozen at -196°C	4/6 heads fertile
Polge	1970	Oviduct infusion of fertile	frozen semen
Crabo & Einarsson Graham			
Pursel & Johnson	1971	inseminate through cervix	fertile
Pursel & Johnson	1975	Beltsville method for practical use of frazen semen	
Paquignon & Court Larsson et al.	1976	method for practical use	

V. 凍結精液의 製造 및 融解

1. 原精液의 處理

採取한 原精液을 바로 授精에 使用하는것 보다는 어느정도 時間을 두어 靜置하였다가 授精에 使用하는 것이 受胎率이 향상된다는 報告가 있다. 또한 凍結融解후의 活力과 受胎率은 凍結하기전 原精液을 5°C에 靜置하였을 때 向上되었다고 報告하고 있다. 이것은 採取한 原精液을 外部條件에 어느정도 靜置하므로써 空間에 精子가 成熟하고 低溫에 대한 저항력을 얻는것으로 示唆된다.

2. 1次稀釋 및 冷却

原精液은 原則的으로 採取후 바로 室溫(25°C 前後)에서 稀釋한후 加급적 次々히 5~7°C의 低溫에 冷却해야 한다. 또 稀釋을 할 때는 原精液에 少量의 保存液을 몇번에 나누어 서서히 混合해야 한다. 갑작스런 稀釋은 精子에 稀釋衝擊을 주어 運動

性和 活力을 나쁘게하는 原因이 된다. 室溫에서 5~7°C까지 冷却하는데 要하는 時間은 60~120분 間이 適當하다.

3. 2次稀釋과 글리세롤添加

2次稀釋은 글리세롤을 포함한 稀釋液으로 1次稀釋한 精液을 다시 稀釋하는 것을 말한다. 稀釋은 5°C와 15°C에서 實施하는데 凍結後의 生存率과 受胎率이 어느溫度에서 效果의인지는 結論을 못얻고 있다. 5°C와 같은 낮은 溫度에서 2次稀釋을 實施하면 글리세롤添加의 영향은 적으나 冷却의 害를 받기쉬우며 15°C에서 실시하면 冷却의 害는 적으나 글리세롤의 해가 크다는 一長一短이 있다. 2次稀釋時 稀釋精液과 2次稀釋液의 溫度는 같아야 한다.

稀釋精液에 2次稀釋液을 添加하는 경우 10分 間격으로 4~5회 나누어 稀釋하므로 稀釋에 의한 衝擊을 줄여 精子로 부터 GOT의 漏出을 줄일수 있다.

4. 글리세롤 평형

2次稀釋後 稀釋한 溫度에서 數時間 靜置하여 精子内外의 글리세롤 濃度간에 平衡이 되도록 時間을 두는 것을 글리세롤 平衡이라 한다. 글리세롤 平衡時間에 관하여는 報告者들간에 差異가 많다. Dukelew와 Graham(1962), 鄭과 任(1978)은 4시

간, (Table 6), Rohliff(1972)는 5시간, Settergren(1958)과 金등(1975)은 12시간이 동결융해후 精子 生存性이 양호하다고 하였으며, Salimon(1973)은 짧은 시간보다 긴시간이 좋다고 하였는데 대체적으로 4~12시간으로 되어있다. 글리세롤 평형시간도 平衡溫度에 따라 左右되며 7°C보다 높은 온도에서는 짧게 낮은 온도에서는 길게하다.

Table 6. Glycerol equilibration and post-freezing sperm libability

Size of straw(ml)	Glycerol equilibration(hr)					
	1	2	3	4	5	6
0.5	10.0	16.0	26.0	37.0	34.0	29.0
1	7.0	13.0	22.0	30.0	36.0	24.0
Average	8.5	14.5	24.0	33.5	32.0	26.5

(Chung & Im, 1978)

5. 精子數

돼지의 경우 凍結精液 製造에는 1回射精의 全精液을 使用하지 않고 射精開始後 첫번째 射精되는 濃厚精液만을 使用한다. 이濃厚精液은 全精液의 80%의 精子가 들어 있으며 1ml當 精子數가 많으며 低溫에 대한 저항성이 높은것으로 되어있다. 또한 2次稀釋精液中的의 精子濃度가 지나치게 높은 것은(Fig 4) 凍結融解後 精子生存性이 낮은 것으로 되어 있다. 濃厚精液의 最終稀釋倍率은 4~5倍를 넘지 않는것이 좋다.

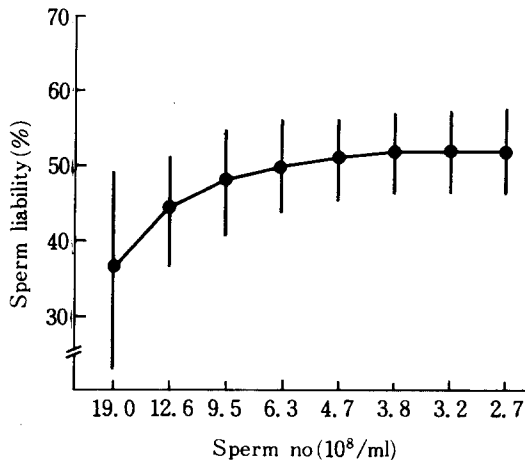


Fig. 4. Effect of sperm concentration on libability of frozen semen

6. 精液의 포장

돼지의 精液은 液體窒素를 利用하여 凍結할 경우는 straw나 알미늄 봉투에 포장되나 錠劑로 凍結하는 경우는 폴리비닐제의 큰 straw에 포장된다. straw의 경우는 0.5 ml와 1 ml을 使用하며, 알미늄 봉투의 경우는 10~15ml 용량의 것을 使用한다. 어느 것이나 50~60 ml의 1回 注精量을 確保하기 위해서는 多數의 straw나 알미늄봉투내 精液을 모아야 한다. 錠劑化 凍結精液의 경우는 드라이아이스 알콜위에서 凍結된 數十個의 錠劑를 1回 注精量이 되도록 굵은 straw에 포장한다. 용기에 정액을 분주한 후 straw는 先端에 straw powder를 충전하므로, 알미늄 봉투는 先端을 뜨거운 인두로 지지므로 봉인을 하게 된다.

7. 凍結速度

精液의 凍結速度는 凍結하는 方法에 따라 달라진다. 5~7°C로 냉각한 알콜에 straw나 알미늄 봉투를 세워놓고 드라이아이스를 조금씩 깨어 넣으며 凍結하는 方法에서는 5°C에서 -15°C까지는 매분 1~2°C씩, -15°C에서 -79°C까지는 매분 3°C씩 냉각동결하는 polge와 Rowson이 소에서 실시한 基本凍結法을 쓴다.

液體窒素가스에 의한 凍結方法에서는 精液容器를 液體窒素上面 약 4~5 cm에 10分間 靜置한후 液體窒素에 浸漬하는데 精子에 有害한 溫度 領域인 5°C에서 -40°C 사이를 2~3 分내로 급속히 通過

하여 10분 이내에 液體窒素가스의 溫度인 -100°C 에 이르며 液體窒素내 浸漬에 의하여 -100°C 에서 -196°C 로 急速凍結하게 된다.

드라이아이스위에 稀釋精液을 0.2 ml내외 滴下하는 錠劑化凍結法은 5°C 에서 -79°C 까지 2~3분내 凍結이 이루어진다.(그림 5). 最近 돼지의 凍結精液 製造方法으로 이 錠劑化凍結法이 主要 使用되고 있다.

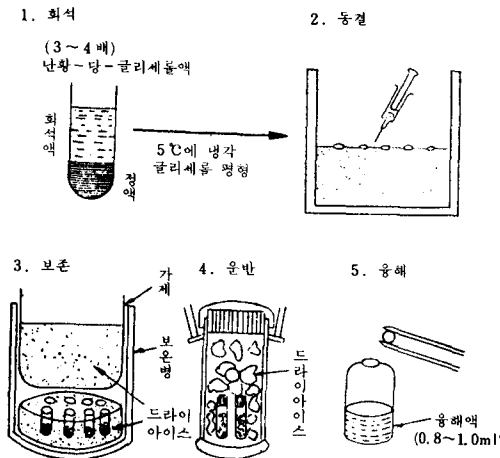


그림 5. 정제화 동결의 요령

8. 貯藏溫度와 期間

液體窒素를 利用하여 凍結精液을 貯藏하기 始作한 이래 凍結精液은 液體窒素의 溫度인 -196°C 에 貯藏하게 되었다. 일단 凍結된 精液은 낮은 溫度에 貯藏할 수록 長期間 保存할 수 있다. 液體窒素가 쉽게 供給되지 못할 때는 드라이아이스·알콜(-79°C)에 貯藏하는 경우가 있는데 液體窒素에 貯藏하는 경우 보다 長期間 保存이 어려우며 長期間 保存하였을 경우 融解後 精子의 活力, 代謝能力 및 受胎能力은 低下한다. 돼지의 경우 아직 長期間 保存한 精液의 受胎成績을 찾아 볼 수 없으나 소에서는 -79°C 에 8年間, -196°C 에 12年間 保存한 精液의 受胎率이 별로 떨어지지 않았다고 보고하고 있으며 2年 6個月 凍結貯藏한 돼지精液을 融解하여 22頭의 암돼지에 外科的으로 子宮卵管接合部를 通하여 卵管内 注入했을 때 20頭(90.9%)가 分娩하여 122頭의 仔豚 1頭平均 6.1頭의

仔豚을 分娩하였다고 Salamon(1976)이 報告한 것으로 볼때 돼지 精液의 경우도 生存率이 높은 狀態로 -196°C 에 凍結保存한 경우 長期間保存하여도 受胎率이 과히 떨어지지 않을 것으로 생각된다.

9. 融解

理論的으로는 急速凍結한 精液은 急速融解하는 것이 融解後 精子生存性이 높은 것으로 되어 있다. 融解速度는 精液容器的 種類(앰플, 錠劑化, 스트로), 融解하는 媒介體(물, 空氣), 溫度, 融解方法에 따라 다르다. 앰플이나 스트로의 精液을 물속에서 融解할 때는 $38\sim 40^{\circ}\text{C}$ 에서 融解하는 것이 이보다 낮은 溫度에서 融解하는 경우 보다 精子生存率이 높다. 4°C 의 水中이나 20°C 의 空氣中에서 融解하는 것은 35°C 의 水中에서 融解하는 것 보다 精子生存率이 낮으며 또 35°C 에서 30초간에 融解하는 것은 75°C 에서 12초간에 融解하는 것 보다 精子生存率이 낮다. 一般的으로 融解速度가 빠를수록 融解後 精子生存率과 頭幅의 損傷率이 낮다.

10. 精液의 凍結過程

Pursel과 Johnson(1975)의 凍結過程은 그림 6과 같다. 본 방법은 現在 實用化되고 있는 돼지凍結精液 製造方法의 基本이 되는 방법이다. 原精液에 耐凍性を 주기 위하여 原精液을 $22\sim 24^{\circ}\text{C}$ 에서 2時間

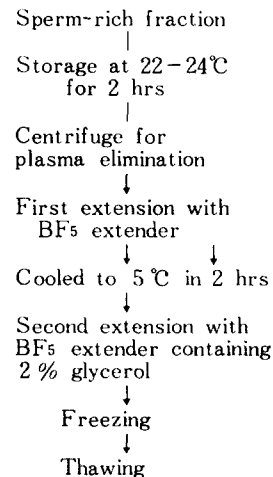


Fig. 6. Freezing process of Pursel & Johnson (1975)

貯藏을 하였으며 遠心分離에 의하여 精漿을 除去한 후 BF₅稀釋液으로 精子를 浮遊한 稀釋精液을 2時間에 5℃로 冷却하고 글리세롤 2% 함유한 BF₅稀釋液으로 2次稀釋후 글리세롤 平衡을 거쳐 錠劑

化凍結하였다. 融解는 錠劑化 한 凍結精液을 42℃의 融解液에 부어 떨어뜨리는 急速融解方法을 採用하였다. BF₅稀釋液과 融解液의 造成은 Table 7 및 Table 8 과 같다.

Table 7. BF₅ Extender (Pursel & Johnson, 1975)

Tes-N- Tris(hydroxy methyl) methyl 2 aminoethan sulfonic acid	1. 2g
Tris(hydroxy methyl) aminethane	0. 2g
Dextrose	3. 2g
Egg Yolk	20. 0ml
Orvus espatе	0. 5ml
Distilled water to final volume	100. 0ml

Centrifuge at 12,000rpm for 10min. Use supernatant

Table 8. Thawing Solution (Pursel & Johnson, 1975)

Dextrose	3. 70g
Sodium citrate	0. 60g
Sodium bicarbonate	0. 125g
EDTA(Sodium ethylenediamine tetra acetate)	0. 125g
Potassium chloride	0. 75g
Distilled water to final volume	100ml

BF₅稀釋液의 特徵은 無機溶媒를 쓰지 않고 Tes-T-Tris methyl 2 aminoethan sulfonic acid와 Tris aminoethane과 같은 非電解質溶媒를 使用하였다는 것과 Dextrose와 같은 有機溶媒를 3.2%로 高濃度 사용하였으며 凍害防止物質로 表面張力劑인 orvus espatе를 사용한 것이다. 融解液의 特徵은 Sodium citrate, Sodium bicarbonate, Potassium chloride 와 같은 塩類를 添加하면서 Dextrose를 7.3%의 高濃度 添加하여 EDTA를 使用한 것이다.

Kato(1976)의 凍結過程은 그림 7 과 같다. 本法에서도 Pursel 등의 方法과 같이 精漿을 除去하였으나 原精液을 22~24℃에 貯藏하는 處理는 두지 않았다. 稀釋液으로 浮遊한 精液을 5℃로 냉각하는데 1℃/6分으로 緩慢冷却을 한 것이 特徵이다. 또한 Glycerol 濃度を 最終 1%로 낮춘 것과 글리세롤 平衡時間을 4시간 으로 짧게 한 것도 特徵이다. Pursel과는 달리 液体窒素가스에서 急速凍結을 擇하고 있다. Kato稀釋液은 Glucose의 濃도가 높고 凍害防止物質로서 Sodium lauryl sulfate를 쓴 것이

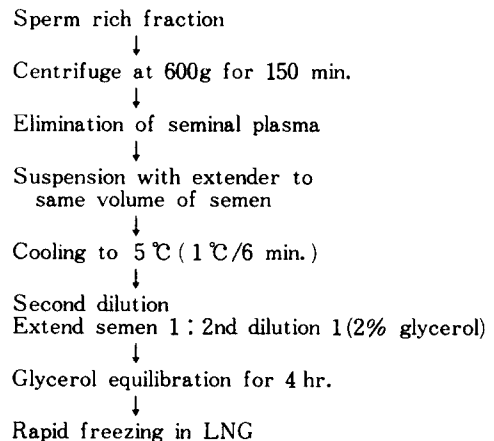


Fig. 7. Freezing process of Kato(1976)

特徵이며 Sodium lauryl sulfate는 粉末로 되어 있어 使用에 便利하다.

Waide(1977)의 凍結精液 製造方法은 그림 8 과 같다. 原精液을 26~27℃에서 30~60分間貯藏한후 精

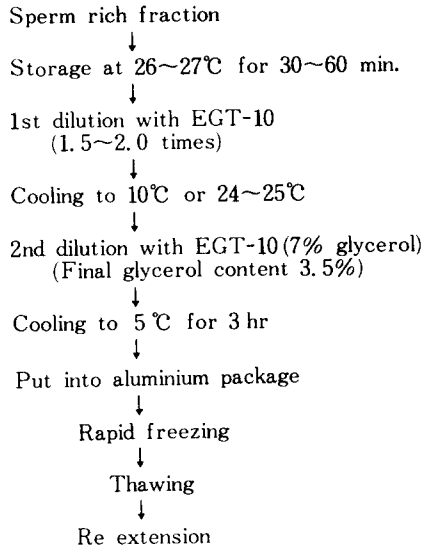


Fig. 8. Freezing process of waide (1977)

Table 9. Extender (Kato, 1976)

Tris aminomethane	1.08g
Citric acid	0.53g
Glucose	2.67g
Sodium lauryl sulfate	0.16g
Streptomycin	0.05g
Penicillin	0.04g
Egg Yolk	20ml
Distilled water to final volume	100ml

漿을 除去하지 않고 EGT-10稀釋液으로 1次稀釋後 10°C 或은 24~25°C로 냉각하여 이 溫度에서 글리세롤 添加 2次稀釋을 實施하여 冷却하며 精液을 多量 알미늄봉투에 넣어 急速凍結을 實施한다.

Table 10. EG-10, Extender (Waide, 1977)

Glucose	5.0g
Fructose	0.5g
Inositol	0.5g
Egg Yolk	10.0ml
Potassium penicillin G	600Iu/ml
Distilled water to final volume	100ml

Waide(1977)의 稀釋液은 糖類와 卵黃만으로 構成되어 있는 것이 特徵이다. 融解後 다시 稀釋하여 글리세롤의 濃度를 줄이고 滲透壓을 조정하여 融解한 精子的 生存性的 維持를 시도하고 있으며 融解液의 造成은 표11과 같다. TPD와 Sørensen phosphate buffer를 使用한 것이 特徵이다.

Table 11. Re-extender (Waide, 1977)

Glucose	5.0g
Inositol	0.5g
TPD (thiamine prapylsulfide hydrochloride)	0.002g
Sørensen phosphate buffer (pH 7.4)	10.0ml
Egg Yolk	2.0ml
Potassium penicillin G	600IU/ml
Distilled water to final volume	100ml

* Use only supernatant from centrifugation at 2,500g for 20 min.

Im과 Chung(1978)의 凍結方法은 그림 9와 같다. 濃厚精液을 精漿을 除去하지 않고 室溫에서 ES稀釋液으로 稀釋한후 서서히 5°C로 冷却한다. 冷却한 稀釋精液을 글리세롤 7%의 S稀釋液으로 2次稀釋하여 글리세롤 最終濃度를 2.33%로 하고 글리세롤平衡 4시간후 液体窒素가스로 急速凍結한다. 精液容器로 0.5와 1ml의 스트로볼 使用하고 있다. Im 등은 1次稀釋液으로 卵黃과 脫脂粉乳를 含有한

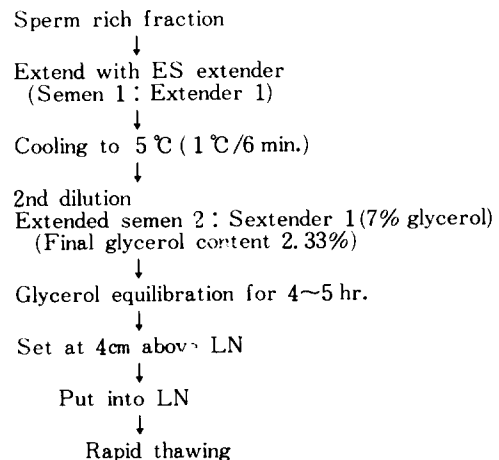


Fig. 9. Freezing process of Im and Chung (1978)

ES稀釋液(표12)를 使用하였으며 2次稀釋液으로는 脫脂粉乳가 主成分인 S稀釋液(표13)을 使用하고 있다. ES稀釋液은 卵黃과 脫脂粉乳를 Trisaminomethane과 Citric acid로 緩衡溶解하고 있으며 冷害保護物質로서 Glucose, Fructose 및 Glycine을 使用하고 있다. 一般적으로 2次稀釋液은 1次稀釋液에 글리세롤을 添加하고 있으나 Im은 1次稀釋液과 組成이 다른 2次稀釋液을 使用한 것이 特徵이다.

Table 12. E. S. Extender (Im & Chung, 1978)

Tris aminomethane	1.514g
Citric acid	0.890g
Glucose	0.165g
Fructose	0.165g
Glycine	0.05g
EDTA (2 Na)	0.10g
Catalase	0.01g
Skim milk	2.50g
Streptomycin	0.10g
Penicillin	0.08g
Egg Yolk	10ml
Distilled water to final volume	100ml

Table 13. S Extender (Im & Chung, 1978)

Skim milk	5g
Glucose	3g
Fructose	3g
Stretomycin	0.1g
Penicillin	0.08g
Distilled water to final volume	100ml

Maxwell(1979)의 凍精液製造方法 A는 그림 10과 같다. 精漿을 除去하고 바로 室溫에서 글리세롤을 함유한 稀釋液으로 稀釋한후 2段階冷却法으로 1時間에 15℃로 冷却한후 다시 1時間에 5℃로 冷却하고 있다. 錠劑化(0.025ml) 凍結法으로 急速凍結을 하고 있다. 또한 Maxwell(1979)의 凍結法 B는 그림 11과 같다. TFE稀釋法으로 1次稀釋후 5℃로서 서히 冷却하고 遠心分離를 하여 原精液의 精漿成分과 1次稀釋成分을 除去한후 글리세롤함유 TFE稀釋液으로 2次稀釋을 하고 있다. A法과 같이 錠劑化 凍結法을 使用하고 있다.

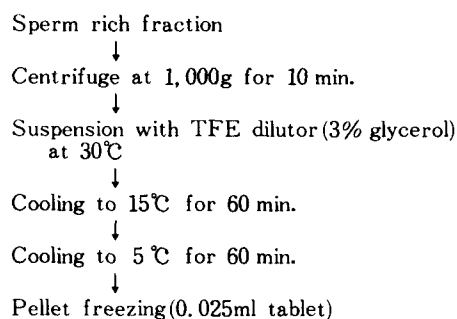


Fig. 10. Freezing process A (Maxwell, 1979)

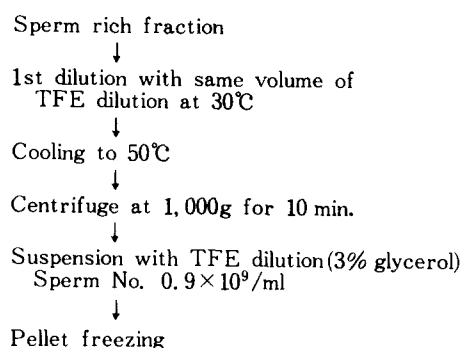


Fig. 11. Freezing process B (Maxwell, 1979)

Maxwell(1979)가 使用한 稀釋液과 融解液의 造成은 표14 및 15와 같다. 兩液 모두 Trisaminomethane, Citric acid와 Fructose를 主成分으로 하고 있으며 融解液에는 EDTA(2Na), 卵黃 및 글리세롤을 添고 있다.

Table 14. TFE Dilutor (Maxwell, 1979)

Tris aminomethane	250mM
Citric acid	175mM
Fructose	110mM
EDTA (2 Na)	15mM
Egg Yolk	15%
Glycerol	3%

Table 15. Thawing Solution (Maxwell, 1979)

Tris aminomethane	250mM
Citric acid	75mM
Fructose	110mM

11. 精液의 融解過程

精液의 融解過程은 精液의 凍結된 狀態에 따라 다르다.

1) 스트로 및 알미늄봉투 凍結精液

스트로나 알미늄봉투에 포장된 精液은 一般적으로 液体窒素가스에서 凍結되어 液体窒素내 保存되므로 融解시는 液体窒素에 浸漬된 精液을 液体窒素가스로 옮겨 10분내외로 放置하여 -196°C 에서 液体窒素가스의 溫度인 -100°C 전후로 上昇시킨 후 $42\sim 75^{\circ}\text{C}$ 의 溫水에 스트로나 알미늄봉투를 直接 담겨 急速融解한다. 이때 注意할 것은 精液에서 얼음의 結晶이 사라져 溫度 $7\sim 15^{\circ}\text{C}$ 사이에서 꺼내도

복 하는 것이다.

2) 錠劑化 凍結精液

外部의 溫度 影響을 적게 받기 위하여 스틸포리 상자를 利用한다. 이 保温箱子에 42°C 의 溫水를 넣고 融解液을 넣은 비자를 담겨 融解液의 溫度를 42°C 에 유지한다. 다른 箱子에 液体窒素저장고에서 꺼낸 舊은 스트로에는 錠劑化 된 凍結精液을 부어 3분정도 放置하여 液体窒素가스를 完全히 蒸발시켜 凍結精液이 약간 融解하려는 때 42°C 로 加溫된 融解液에 凍結精液을 넣어 融解한다.

패지의 凍結精液을 輸出하는 World Wire Sire Inc의 融解過程은 그림12와 같다.

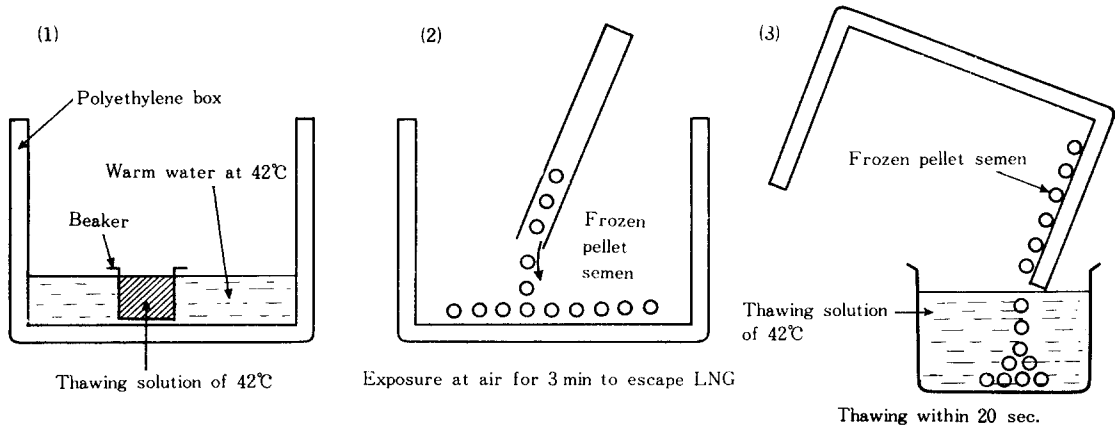


Fig. 12. Thawing method of frozen pellet semen by World-Wide sire INC

IV. 凍結精液의 受胎率

凍結精液에 의한 受胎率은 패지의 동결정액이 實用化될 수 있겠느냐 없겠느냐의 열쇠가 된다. 1950년에서 1977년 사이의 여러 연구자들의 製造方法과 相關한 受胎成績은 표16과 같다. 1969년 Waide까지는 稀釋液中的 글리세롤 첨가량을 $5\sim 10\%$ 로 하고 있으며 受胎率도 Waide의 66.6% 를 제외하고는 $0\sim 28.0\%$ 로 극히 不良하다. 1971년 이후 受胎率이 상당히 向上되었는데 그 理由로서 (1) 最終稀釋精液內 글리세롤 含量을 낮추었고 (2) 稀釋液으로 트리 스緩衡液이 사용되었으며 (3) 錠劑化 凍結方法이 導入된 것을 들 수 있다.

凍結精液의 受胎率과 産仔數에 대하여 實驗한 成績은 표17과 같다. 受胎率은 $57.8\sim 81.8\%$, 평균 산자수는 $8.4\sim 9.7$ 두로 凍結精液으로서의 比較的 좋은 成績을 보여주고 있다.

Johnson(1981)은 荷蘭에서 36個 農場을 대상으로 대대적인 野外試驗을 實施하였는데 液狀精液과 凍結精液의 分娩率 및 産仔數는 표18과 같다. 즉 液狀精液과 凍結精液의 分娩率은 79.1% 와 47.0% 였고 生存産仔數는 각각 9.9頭와 7.1頭로 液狀精液이 좋으나 대대적인 野外試驗에서 凍結精液이 이 정도의 成績을 보여준 것은 凍結精液이 種畜生産이란 特別한 目的을 위해서는 實用될 수 있음을 示唆하고 있다.

한편 Pursel 등(1981)이 液狀精液과 凍結精液에 대하여 실시한 分娩率과 産仔數는 표19와 같다. 對照 및 發情同期化한 암패지의 分娩率과 産仔數는 凍結精液이 液狀精液보다 낮았으나 凍結精液으로서의 比較的 좋은 成績을 보이고 있다.

Westendorf 등(1975)은 凍結精液에 있어서 注入精子數와 經産豚 및 未産豚이 受胎率에 미치는 影響에 關한 試驗을 實施하였는데 結果는 표20과 같

Table 16. Conception of frozen boar semen

Author(year)	Extender & Freezing method	Thawing	Head No. of A. I	Conception
Polge(1956)	Glycerol 10%		35	0
Hess et al. (1957)	Glycerol 7 %		25	28.0
Hoffman(1959)	Glycerol 8 ~10%		11	9.0
King & Mcpherson(1969)	Glycerol 7 %		24	0
Waide(1969)	Glycerol 5 ~ 7 %		6	66.6
Graham et al. (1971a)	TEST dilution, pellet Glycerol 2~3%	60°C	22	36.9
Graham(1971b)	TEST dilution, pellet " 7%	65°C	26	0
	" 1%	65°C	26	15.4
	" 0%	65°C	24	45.8
Persel et al. (1971a)	BF ₃ , pellet Glycerol 2~3%	37°C	12	83.3
Persel et al. (1971b)	BF ₃ , pellet Elimination of seminal plasma	37°C	10	80
	Sperm rich fraction	37°C	10	40
Salamon et al. (1974)	TES, Pellet glycerol 2%	30°C	76	43.4
Crabo & Einarrson(1971)	TES, Pellet glycerol 2~3%	Thawed in seminal plasma	7	85.4
Graham et al. (1973)	TES, Pellet glycerol 2~3%	Thawed in seminal plasma 30°C/min	91	48.0
Harashima (1973)	Elimination of seminal plasma, Glycerol 2~3%	Thawed in seminal plasma	13	46.0
Pursel et al. (1975)	BF ₅ dilutor, Pellet glycerol 2~3%	BTS Thawing. sol 50°C	26	84.6
Mikawa(1977)	EGT 24 - 10	Seminal plasma	5	40.0
		EGT 24 - 10	5	60.0

Table 17. Pregnancy rates and litter sizes after insemination of boar spermatozoa frozen according to the methods of the given authors

Method	Reference	Number of sows/gilts			Mean litter size
		Inseminated	Pregnant	%	
Pursel and Johnson	Johnson et al. (1978)	33	27	81.8	9.5*
		144	92	63.9	
Westendorf et. al.	Richter et al. (1976)	201	139	69.2	8.4
Paquignon and Courot	Paquignon et al. (1977)	138	80	57.8	9.7
Larsson et al.	Larsson et al. (1977)	36	28	72	9.7*

* Estimated at slaughter 28 days post coitum

다. 精子數가 많을수록 受胎率이 높았고 未産豚 보다는 經産豚이 受胎率이 높았다.

한편 Pursel 등(1981)이 凍結精液의 注入量이 分挽率, 生存産仔數 및 離乳産仔數에 미치는 效果에

Table 18. Farrowing rate and litter size of liquid and frozen semen

Semen	Sow		Farrowing rate	Litter size		
	No. Insemi.	No. Farr.		Total	Live	Dead
Liquid	249	197	79.1	10.6	9.9	0.7
Frozen	202	95	47.0	7.4	7.1	0.3

Johnson (1981)

Table 19. Farrowing rate and litter size of liquid and frozen semen

	Synchronization*		Control	
	Liquid semen	Frozen semen	Liquid semen	Frozen semen
Farrowing rate (%)	93.1	48.3	86.8	56.7
Litter size	10.3	9.2	10.1	6.4

* Allyltrenbolone 15mg/gilt for 18 days estrus between 4~7 days (Pursel, 1981) after with drawl

Table 20. Effect of sperm number on conception of frozen semen

Group	Sperm No. $\times 10^9$	No. of head A. I.	No. of Conception	Conception rate (%)
1	3.33	Sow 21	16	76.2
		Gilt 9	5	55.6
		Mean 30	21	70.0
2	2.80	Sow 16	9	56.3
		Gilt 4	2	50.0
		Mean 20	11	55.0
3	2.95	Sow 17	9	52.9

관하여 실시한 成績은 表21과 같이 注入量 80ml가 55ml보다 分娩率, 生産産仔數 및 離乳産仔數가 훨씬 높았다.

VII. 授精方法

凍結精液의 授精方法은 근본적으로 液狀精液과 다를 바 없으나 凍結精液은 融解後 精子의 生存時間이 体外에서나 体内에서 짧기 때문에 融解後 가급적 빠른 시간내에 注入하여야 하며 授精適期를 정

확히 포착하여 注入할 필요가 있다. 授精適期의 가장 正確한 判斷은 發情牝豚이 牝許容姿勢를 취하느냐를 아는 것인데 試情牝豚을 使用하는 것이 바람직하다. World Wide Sire Inc에서 권장하는 授精適期는 經産豚에서는 牝許容發情後 22~26時間, 未産豚에서는 16~20시간으로 되어 있으며 經産豚에서는 12時間 間隔으로 2회 授精을 未産豚에서는 8시간 간격으로 2회 授精하며 혹 3회 授精때는 2회 授精後 6시간에 授精하는 것을 권하고 있다. 注入量은 融解한 精子의 活力, 生存率 및 濃度에 左右되

Table 21. Farrowing rate and semen volume in seminated frozen semen

	Semen volume	
	55ml	80ml
Frawing rate	44.8	60.0
Litter size lived	7.3	7.9
Litter size weaned	6.6	7.0

(Pursel, 1981)

며 最少限 80ml 이상을 注入할 需要가 있다. 또한 授精의 對象이 되는 牝豚 選定에 있어서도 各別히 有意해야 한다. 最上의 發情條件에 있는 牝豚을 選定하는데 30日前後의 哺乳期間을 갖었던 營養狀態가 좋은 牝豚, 離乳後 4~7日 이내에 發情이 온 牝豚 등에서 좋은 成績을 기대할 수 있다.

精液을 注入할 때는 注入器의 先端이 確實히 子宮頸管을 通過하여 精液送流가 없어야 할 것이다. 精液注入後에도, 牝許容狀態가 8~12시간 계속되면 2回 注入을 하는 것을 잊지 말아야 할 것이다.

또 融解한 精液은 低溫衝擊을 받지 않도록 주의하여야 하며 이를 위하여 授精專用室을 確保하여 25℃ 前後의 室溫條件에서 人工授精을 실시하는 것도 한 방법이다.

VIII. 受胎後 向上方案

이상의 고찰에서 알 수 있는 바와 같이 凍結精液의 受胎率은 30~70%의 범위에서 流動的이다. 따라서 돼지의 凍結精液에서 높은 受胎率을 얻기 위하여는 (1) 동결정액을 製造시 동결이 잘 되는 우수한 種牝豚을 選拔하여 좋은 精液을 採取하여 融解生存性과 活力이 높은 凍結精液을 製造하여야 한다. (2) 融解時는 生存性이 높도록 42~75℃에서 急速融解하되 融解한 精液이 室溫을 넘지 않도록 注意해야 한다. (3) 融解한 精液은 低溫衝擊을 받지 않도록 25~30℃를 유지해야 한다. (4) 일단 融解한 精液은 짧은 時間내에 注入을 하여야 한다. (5) 授精前後에 반드시 生存性을 檢査하여 좋은 精液만을 注入해야 한다. (6) 離乳後 4~6日 사이에 發情한 좋은 상태에 있는 牝豚에만 수정해야 한다. (7) 試精牝豚을 使用하여 授精適期를 正確히 파악한 후 授精한다. (8) 精液注入時 精液이 逆流하지 않도록 서서히 注入을 하여야 한다. (9) 가능한한 注入量과 回數를 늘리도록 한다.

IX. 結 論

돼지의 凍結精液은 凍結精液의 利點을 살리기 위하여 實用化되어야 한다. 이 實用化를 위하여 돼지의 凍結精液에 관한 많은 研究가 이루어졌다. 美國에는 一部 돼지 凍結精液이 實用化되고 있으며 凍結精液을 輸出하는 會社도 設立되어 運營되고 있다. 우리나라에서도 돼지의 凍結精液이 實用化되기 위

해서는 各別한 關心을 가지고 凍結精液製造 및 受胎시험에 관한 研究가 필요하며 돼지 凍結精液에 관한 養豚家의 깊은 理解와 專門的인 知識이 필요하다.

V. 引用文獻

1. Bower, R.E., B.G. Crabo, M.M. Pace and E.F. Graham, 1973. Effects of dilution and glycerol on the release of glutamic-oxaloacetic transaminase from boar spermatozoa. *J. Anim. Sci.*, 36(2): 319-324.
2. Graham, E.F., A.H.J. Rajamannan, M.K.L. Schmehl, M. Maki-Laulila and R.E. Bower, 1971. Fertility studies with frozen boar spermatozoa. *A.I. Digest*, 19(6): 6-16.
3. Hughes, P.E. and M.A. Varley, 1980. Reproduction in the Pig. *Butteeworth & Co. Ltd.*
4. Johnson, L.A., J.G. Aalbers, C.M.T. Willems and W. Sybesma, 1981. Use of boar spermatozoa for artificial insemination 1. Fertilizing capacity of fresh and frozen spermatozoa in sows on 36 farms. *J. Anim. Sci.*, 52(5) 1981.
5. Johnson, L.A., J.G. Aalbers, C.M.T. Willems, J. H.M. Rademaker and C.E. Rexroad, 1982. Use of boar spermatozoa for artificial insemination III. Fecundity of boar spermatozoa stored in beltsville liquid and KIEV extenders. *J. Anim. Sci.*, 54(1): 132-136.
6. King, G.J. and J.W. Macpherson, 1966. Fertility of liquid boar semen. *A.I. Digest*, 14(12): 6-16.
7. Maxwell, W.M.C. and S. Salamon, 1979. Fertility of frozen-thawed boar semen. *Aust. J. Biol. Sci.*, 32: 243-249.
8. Polge, C., S. Salamon and J. Wilmut 1970. Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical insemination. *The Vet. Rec.* 87: 424-428.
9. Purael, V.G., L.A. Johnson and G.B. Rampacek, 1972. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. *J. Anim. Sci.*, 34(2): 278-283.
10. Pursel, V.G. and L.A. Johnson, 1975. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J. Anim. Sci.*, 40(1): 99-102.

11. Pursel, V.G. and L.A. Johnson. 1976. Frozen boar spermatozoa: methods of thawing pellets. *J. Anim. Sci.*, 42(4): 927-931.
12. Pursel, V.G., D.O. Elliott, C.W. Newman and R.B. Staigmiller. 1981. Synchronization of estrus in gilts with allyl trenbolone: Fecundity after natural service and insemination with frozen semen *J. Anim. Sci.*, 52(1): 130-133.
13. Salisbury, G.W., N.L. Van Demark and J.R. Lodge. 1978. *Physiology of Reproduction and Artificial Insemination* Freeman Co.
14. Westendorf, P., L. Richter und H. Treu, 1975. Zur tiefgefrierung von ebersperm: labor-und besamungsergebnisse mit dem hulsenberger palletten verfahren. *Disch Tierarztl. Wschr.* 82: 261-300.
15. Wilmut, I. and C. Polge. 1977. The low temperature preservation of boar spermatozoa.3. The fertilizing capacity of frozen and thawed semen. *Cryobiology*, 14: 483-491.
16. 김중계, 서국성, 신원집, 설동섭, 이용빈. 1972. 돼지의 냉동정액 제조과정이 정액성상과 수태에 미치는 영향
17. 任京淳, 鄭場龍. 1978. 豚精液의凍結保存에 관한 研究. 1. 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. *韓畜誌*, 20(6) : 586~591
18. 鄭場龍, 任京淳. 1979. 豚精液의凍結保存에 관한 研究. II. 凍結融解가 精子頭帽의 形態 및 受胎에 미치는 影響.