

최소 동결 정액 생산을 위한 스티로폼상자와 액체질소 이용 방법

김성우^{1*}, 고응규¹, 이재영¹, 김찬란¹, 황인설²

¹농촌진흥청 국립축산과학원 가축유전자원센터, ²농촌진흥청 국립축산과학원 동물바이오통계학과

The Use of Styrofoam Box for Chikso (Korean Brindled Cattle) Semen Cryopreservation with Liquid Nitrogen

Sung Woo Kim^{1*}, Yeoung-Gyu Ko¹, Jae-Yeong Lee¹,
Chan-Lan Kim¹, In-Sul Hwang²

¹Animal Genetic Resources Research Center, National Institute of Animal Science, RDA

²Animal Biotechnology Division, National Institute of Animal Science, RDA

요약 가축유전자원으로서 동결정액을 생산하는 가장 쉬운 방법은 스티로폼박스를 이용한 간이동결법으로 알려져 있다. 본 연구에서는 스티로폼 동결박스를 제작하여 가축의 동결정액 생산에 활용하는 방법을 검토하였으며 최소 동결정액 생산을 최적화 할 수 있는 방법을 제시하고자 박스의 크기, 액체질소와 노출된 정액 스트로와 거리, 노출시간 및 생산량을 검토하였다. 2가지 동결박스를 비교하여 자료를 확보하였으며 내부 크기는 세로×가로×높이가 23.5×30.5×22.5 cm와 25.5×46.5×26.5 cm로 측정되었다. 액체질소를 5cm 높이로 채우고 액체질소 위 2, 5 및 8cm 높이에서 동결하여 용해 후 생존성을 조사하였다. 최소 정액을 동결할 경우, 액체질소와의 노출시간은 모두 10분이 적절하였으며 25.5×46.5×26.5 cm 크기의 상자가 높은 생존율을 보여주었다(60.4±5.3% 대 67.2±3.1%). 동결 상자의 최적화 공간은 정자 동결에 가장 중요한 요소로 판단되며 1회 동결 시 최대 생산 가능한 최소 동결정액은 60개 이상으로 증가시킬 수 있었다. 이러한 정보를 활용하면, 축종에 따라 동결 정액 생산량 결정하고 목적에 맞는 용기를 활용하여 효율적인 동결정액 생산이 가능할 것으로 판단된다.

Abstract A styrofoam box is used as a simple and easy freezing method to preserve animal semen as a livestock genetic source. This study optimized the methods of freezing chikso brindled cattle semen. To test the freezing box, the motility of spermatozoa was compared between two box sizes (length×width×height) with the dimensions of 23.5×30.5×22.5 cm and 25.5×46.5×26.5 cm. The motility of thawed sperm from brindled Korean bulls was used to confirm the efficiency of the freezing boxes. The box having a larger inner space with larger horizontal and height measurements supported better motility after thawing (60.4±5.3% vs 67.2±3.1%) with 10 min of exposure time in liquid nitrogen vapor. The optimized freezing space is estimated to be an essential element for successful freezing results and the larger box could be used for production of more than 60 frozen semen straws. These properties are also helpful to optimize the cryopreservation techniques that would control the quality and quantity of semen straws according to different animal species.

Keywords : Styrofoam Box, Semen, Cryopreservation, Animal Genetic Resources, Liquid Nitrogen

본 논문은 농촌진흥청 연구사업(PJ01335402)의 지원으로 수행되었음.

*Corresponding Author : Sung Woo Kim(Rural Development Administration)

email: sungwoo@korea.kr

Received December 16, 2019

Revised January 15, 2020

Accepted April 3, 2020

Published April 30, 2020

1. 서론

정자의 동결은 가축유전자원을 영구 보존하는 가장 쉬운 방법으로 알려져 있다. 정액 동결보존에 대한 연구는 1949년 Polge에 의하여 글리세롤의 기능이 밝혀지면서 시작되었다[1]. 그 후, 소를 중심으로 동결정액에 생산에 대한 연구가 발달하여 동결정액기술은 산업적 영향력이 매우 높아졌으며 육종과 송아지 생산에 널리 이용되고 있다[1, 2]. 가축의 번식과 육종을 위하여 반드시 필요한 동결 정액은 가축마다 최적 정자 농도가 다르며 축종에 따라 동결정액을 생산하는 방법이 상이하다. 종 특성에 따라 1회 인공수정에 필요한 정자 수, 희석액 및 동결 보호제가 서로 달라 축종에 따른 차별적인 연구 결과가 존재한다[2].

최근, 주요 축종 정자를 동결하고자 할 때, 프로그램화된 동결장비가 이용되기도 하지만, 고가의 장비로 일반 농가나 소규모의 실험실에서 활용하기 힘든 문제점이 존재한다[3, 5]. 학계에서도 다양한 동물의 정액을 동결 보존하는 것은 여러 가지 실험 목적에 따라 반드시 필요하며, 번식연구를 위하여 동결정액을 생산 및 보존하는 것은 기초 연구라고 판단된다. 또한, 사람의 경우, 불임 치료를 위하여 인공수정기술과 체외수정기법을 이용할 때, 동결정액생산은 매우 중요하다[2].

가축에서 동결정액을 생산하는 방법을 살펴보면, 우수한 수컷에서 사출된 신선정액을 얻고 적절한 희석제를 활용하여 축종에 맞는 농도로 희석하여야 한다[3]. 희석된 정액을 상온에서 일정시간 노출시키고 천천히 5℃로 냉각하고 정액 보존용 스트로에 포장한 후 액체질소 위에 정치하여 동결정액 내 얼음결정을 고르게 형성되도록 유도하고, 액체질소에 침지시켜 영구보존한다[3, 4]. 정자 동결에 이용되는 용기는 흔히 스티로폼박스를 이용하지만, 시중에는 다양한 크기의 박스가 판매되고 있으므로 적절한 상자를 선택하는데 어려움이 존재한다. 또한, 동결정액 생산용 간이동결법을 최적화하기 위하여 적절한 냉각 속도와 공간을 제공할 수 있는 상자에 대한 자료가 적으며, 이를 비교 검토한 연구는 찾아보기 힘들다. 그러므로 본 연구는 시중에서 쉽게 구입할 수 있는 스티로폼박스 2종을 선택하여 가축 동결유전자원의 생산에 이용 가능한 최적의 방법을 찾아내기 위하여 연구를 수행하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 실험동물과 정액의 채취

국립축산과학원 가축유전자원센터에서 유전자원으로 보유하고 있는 최소 5두를 공시동물로 사용하였고 승가를 유도하여 인공질로 정액 사출을 실시한 후 정자의 운동성이 우수한 시료를 이용하였다.

2.2 동결 상자의 제조

시중에서 흔히 사용되고 있는 스티로폼 박스를 구입하였으며 내부 공간이 2가지 형태의 동결박스를 사용하였다. 내부 공간의 크기(세로×가로×높이)가 23.5×30.5×22.5 cm와 25.5×46.5×30.0 cm인 박스를 동결 상자를 제조하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 동결 상자의 높이를 조절하기 위하여 스티로폼 열선 절단기를 활용하여 높이를 각각 20과 26.5 cm로 조절하여 동결상자의 공간을 조절하였다. 또한 측면 양쪽에는 잘라낸 스티로폼의 일부를 공업용 실리콘 접착제를 이용하여 질소 위 공간을 마련하는 지지대를 제조하였다. 수정란 이식에 사용하는 플라스틱 커버(embryo transfer sheaths)내부에 2 mm 굵기의 직선 스테인리스 철사를 끼워 양 측면 지지대 위에 올려 정액스트로가 질소 위에 유지되도록 고안하였다. 스트로 지지대는 열수축튜브를 잘라 철사에 끼운 후 열풍기로 가열하여 플라스틱 위에 요철부분을 나타나도록 성형하였다. 이러한 형태는 동결 중에 스트로 사이의 적절한 너비를 유지할 수 있도록 제조하였다.

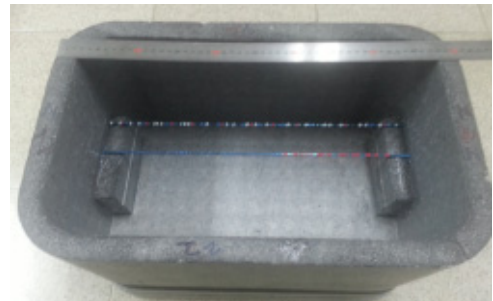


Fig. 1. The image of freezing box with supporting rods

2.2 정액의 동결

2.2.1 희석제의 제조 및 신선정액의 희석

최소의 정액을 희석하고 실험실로 10분 이내로 이송하였으며 30~32℃로 가온된 희석액과 동일한 온도로 조절하였으며 Triladyl 희석액을 정액에 점적하여 천천히 희석하였다. 희석액은 Triladyl 원액(Mini tube®, Germany): 세포배양용물:난황의 부피 비율이 1:3:1로 구성되었으며

난황 1부피에 초순수 3부피를 천천히 투입하면서 교반을 실시하였으며 약 1시간 동안 상온에서 교반한 후 Triladyl 원액 1부피를 투입하여 약 30-40분간 더 교반하여 희석액을 제조하였다. 1차 희석 후 5분 후에 Makler[®] counting chamber(Sefi-medical Instruments Ltd)를 이용하여 정자의 농도를 측정하였으며 2차 희석을 동일한 희석제를 투입하여 최종 정자농도가 $60\sim 80 \times 10^6$ 개/ml 이 되도록 조절하였다. 희석이 끝난 정액은 상온에 15분간 방치하였다.

2.2.2 희석정액의 냉각

희석된 침소 정액을 50 ml 시험관에 담아 파라필름으로 밀봉한 후, 500 ml 부피의 용기에 담고, 상온과 동일한 온도의 물에 노출시켜 실험용 얼음(ice slurry)에 2~3 시간동안 방치하여 5℃로 천천히 냉각하였다.

2.2.3 정액의 포장 및 동결

5℃로 냉각된 정액을 저온정액처리장치(FHK, Japan)에서 0.5 ml straw에 봉입하였다. 끝부위는 초음파접합기(Ultraseal 21, Mini tube)를 이용하여 밀봉하였다. Fig 2는 액체질소를 담고 있지 않은 상태에서 정액 스트로의 올린 모양을 보여주고 있다. 동결을 실시할 때 액체질소를 원하는 수위까지 담아서 1분간 정치하여 안정화를 실시한 후, 일부 증발된 질소가스를 전기청소기를 이용하여 제거하였다. 냉각된 정자를 지지대 위에 올려두고 스티로폼 박스 뚜껑을 덮고 일정시간 노출하였다. 동결이 완료된 정액 스트로는 액체질소에 바로 침지하였고 액체질소 용기에 보존하였다.

2.2.4 동결정액의 용해 및 운동성 관찰

동결된 정자는 37℃에서 1분간 용해하였으며 10배 암시야 대물렌즈가 장착된 정립현미경(Nikon ECLIPSE Ci, Japan)으로 관찰하였다. 정자의 운동성을 유지하기 위하여 온도 조절장치가 장착된 현미경 재물대에 정자를 관찰하면서 디지털 정자자동분석기(computer assisted sperm analysis, ISAS, Poiser R&D, Spain)를 이용하여 정자의 운동성을 분석하였다.

2.3 질소 증기 노출시간

동결상자에서 질소 표면과 정치되는 정액 스트로 사이의 높이를 5 cm로 고정하고 노출되는 시간을 5, 10, 15 및 20분으로 조절하여 동결을 실시하였으며, 용해 후 운동성을 관찰하였다.

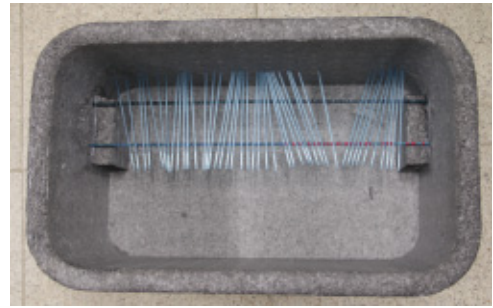


Fig. 2. The freezing box containing 44 straws without liquid nitrogen

2.4 액체질소 표면과 스트로 간 거리

동결상자 내 액체질소의 양을 조절하거나 측면 스티리폼 높이를 조절하여 액체질소표면과 정액 스트로 사이의 거리를 조절하였다. 정액이 동결되는 위치는 액체질소 위 2.5, 5, 7.5 및 10 cm로 조절하여 동결을 실시하였으며 용해 후 정자의 운동성을 관찰하였다.

2.5 동결상자 높이의 영향

동결상자의 내부 공간이 25.5×46.5×30.0 cm인 스티로폼박스를 스티로폼 절단기로 재단하여 높이를 20, 25 및 30.0 cm로 조절하였다. 질소 위 5cm 위치에 동결 스트로를 10분 간 노출하여 동결정액을 제조하였고, 용해 후 정자의 운동성을 관찰하였다.

2.6 동결정액 생산량 분석

1회 동결을 실시 할 때 사용되는 액체질소를 이용하여 얼마나 많은 양의 동결정액을 생산할 수 있는가를 추정하기 위하여 스테인리스 지지대 위에 적재되는 동결 스트로의 수를 조절하였다. 정액 스트로의 양을 5개, 15개, 30개의 정자를 23.5×30.5×22.5 cm 크기 상자로 동결하고 용해 후 정자 운동성을 분석하였으며 25.5×46.5×30.0 cm 크기의 상자에는 15, 30 및 80개 정자 스트로를 정치하여 동결한 후 용해 후 정자 운동성을 분석하였다.

2.7 통계 분석

용해된 정자의 운동성은 One-way ANOVA test를 실시하여 분석하였으며 분석된 자료의 평균 간 유의성은 Duncan의 다중검증법(Duncan's multiple range test)로 분석을 실시하였다.

3. 실험결과

3.1 질소 증기 노출시간이 미치는 영향

선정된 2가지 크기의 동결상자를 이용하여 최소의 신선정액을 액체질소 표면 위 10cm에서 동결을 실시하고 질소 증기에 노출되는 시간을 5, 10, 15 및 20분간 노출하여 동결하였다. 표 1에서 보는 바와 같이 희석 후 운동성은 모두 90% 이상의 수치를 보여주었으나 동결 후 용해된 정자의 성적은 스티로폼상자가 큰 경우에 최대 67.4%로 우수하였으며 유의적 차이가 존재하였다($p < 0.05$). 액체질소에 대한 정액 스트로의 노출시간에 따라 용해 후 정자 운동성에 차이가 존재하였다. 작은 형태의 스티로폼상자에서 액체 질소에 10 및 15분 처리하여 동결한 성적이 5분 및 20분 보다 우수하였으며 (56.9%, 52.8% 대 44.0%, 49.1%) 유의적 차이가 존재하였고 큰 상자에서도 동일한 결과(67.4%, 65.8% 대 38.8%, 53.6%)를 얻을 수 있었다($p < 0.05$).

Table 1. The effect of exposure time freezing box size on the motility of Chickso spermatozoa with different exposure time on the vapour of liquid nitrogen and 5 cm distance.

Box type (L×W×H cm)	Exposure time (min)	% of motile sperm in	
		Diluted	Frozen
23.5×30.5×22.5	5	94.5±2.3	44.0±4.5
	10	93.5±1.0	56.9±4.4 ^a
	15	94.5±2.6	52.8±5.1
	20	95.1±2.6	49.1±5.1
25.5×46.5×26.5	5	92.3±2.9	38.8±7.7
	10	93.8±1.2	67.4±4.5 ^{ba}
	15	94.1±2.2	65.8±7.0 ^b
	20	93.3±2.7	53.6±9.3

Means with small letters of superscripts were significantly different within groups ($p < 0.05$).

Means with capital letters of superscripts were significantly different between groups ($p < 0.05$).

The experiment was replicated 3 times.

3.2 액체 질소 표면과 스트로 간 거리의 효과

포장된 최소의 정액 스트로는 동일한 스티로폼 동결상자에서 액체 질소 표면과 스트로의 거리를 2.5, 5, 7.5 및 10 cm로 조절하였다. 10분간 질소 가스에 노출하고 액체질소에 침지하였고 용해 후 정자의 운동성을 조사하였다. 표 2에서 보는 바와 같이 희석 후 정자의 운동성은 모두 90% 이상이 관찰 되었으며, 액체 질소와 스트로 사

이의 거리에 따라 서로 다른 정자 운동성을 관찰할 수 있었다. 10분으로 노출시간을 고정할 때, 작은 스티로폼 상자의 경우 5 cm에서 가장 높은 성적(6.78%)을 얻었으나, 7.5 cm 노출거리와 유의적 차이는 없었다($p > 0.05$). 크기가 큰 상자의 경우에도 5 cm 높이가 성적이 우수하였으며 7.5 cm와 차이가 없었다. 큰 상자의 경우, 5 cm 거리에 노출될 때, 작은 상자보다 더 우수한 운동성을 관찰할 수 있었다($p < 0.05$).

Table 2. The effect of exposure distance between liquid nitrogen surface and straw holding place with 10 min exposure time.

Box type (L×W×H cm)	Distance (cm)	% of motile sperm in	
		Diluted	Frozen
23.5×30.5×22.5	2.5	92.9±1.4	24.6±3.1
	5	94.2±0.7	62.9±2.3 ^a
	7.5	92.6±3.6	62.1±9.1 ^a
	10	91.9±1.4	37.1±7.5
25.5×46.5×26.5	2.5	93.4±2.0	46.3±8.9
	5	92.1±4.0	73.3±5.5 ^{ba}
	7.5	94.1±2.2	65.8±7.0 ^b
	10	93.3±2.7	53.6±9.3

Means with small letters of superscripts were significantly different within groups ($p < 0.05$).

Means with capital letters of superscripts were significantly different between groups ($p < 0.05$).

The experiment was replicated 3 times.

3.3 대형용기의 높이가 운동성에 미치는 영향

동결 상자의 공간이 최소 동결 정자의 생존성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 바닥 내부의 넓이가 25.5×46.5 cm의 동결상자를 이용하였다. 높이를 20, 25 및 35 cm로 동결상자의 내부 높이(Height)를 조절하고, 5 cm의 질소 위 높이와 10분간 노출시간으로 동결 보존하였다. 표 3에서 보는 바와 같이 용해된 최소의 정자 운동성은 20 cm에서는 41.1%를 나타내었으나, 25 cm에서는 68.4%, 30 cm에서는 67.6%를 관찰하였다.

Table 3. The effect of box height on the motility of frozen chikso semen.

Box type (L×W cm)	Height (cm)	% of motile sperm in	
		Diluted	Frozen
25.5×46.5	20	92.1±3.1	41.1±5.0
	25	88.0±2.4	68.4±4.0 ^a
	30	93.0±3.2	67.6±5.7 ^a

Means with small letters of superscripts were significantly different within groups ($p < 0.05$).

The experiment was replicated 3 times.

3.4 스티로폼 용기 크기에 따른 동결정액 생산량

선정된 2가지 크기의 동결상자에서 생산 가능한 동결정액 최대 생산량을 추정하기 위하여 정액 스트로의 개수에 따른 정자 생존율을 조사하였다. 표 3에서 보는 바와 같이, 크기가 작은 동결상자의 경우, 5개와 15개 사이에 유의적 차이는 없었으나, 30개 이상의 스트로를 동결할 경우, 52.8%로 낮아졌으며 큰 형태의 박스의 경우, 60개 까지 큰 변화가 존재하지 않았다.

Table 4. The effect of box size on the productivity of frozen semen straw.

Box type (L×W×H cm)	straw (n)	% of motile sperm in	
		Diluted	Frozen
23.5×30.5×22.5	5	89.9±3.3	56.7±6.9 ^a
	15	89.0±2.5	60.4±5.3 ^a
	30	91.4±3.1	33.8±6.2
25.5×46.5×26.5	15	87.1±3.5	66.9±5.2
	30	85.8±2.8	67.2±3.1
	60	90.4±4.7	65.8±7.0

Means with small letters of superscripts were significantly different within groups ($p<0.05$).

Means with capital letters of superscripts were significantly different between groups ($p<0.05$).

The experiment was replicated 3 times.

4. 고찰

가축의 동결 정액을 생산하는 방법은 매우 오래된 역사를 가지고 있다[6, 16]. 난황과 글리세롤의 사용으로 동결정액 생산이 실용화 되었으며, 소의 경우 인공수정에 활용되어 육종 산업의 근간을 이루게 되었다[6-9, 12]. 현재 정자를 동결 하는 방법에는 간이동결법과 프로그램 동결기를 활용하는 방법이 존재한다[5]. 간이동결법은 비용을 절감할 수 있고, 쉽고 빠르게 정액을 동결할 수 있으나, 프로그램 동결기를 활용하는 방법은 장비 가격이 비싸며, 고정형태로 이송이 불가능한 단점이 존재한다[11]. 그러므로 야외에서 정자를 동결해야만 하는 경우와 장비를 보유하고 있지 않은 연구실 및 소규모 증소가축의 경우에는 간이동결법을 활용하여 동결정액을 생산하여야 한다[5, 10-11]. 또한, 고가의 프로그램 동결기의 원리 자체도 스티로폼 박스를 이용한 간이동결법의 최적화 결과에 의하여 고안되었기에 두 가지 방법으로 생산된 자료는 큰 차이가 없을 것으로 판단된다.

본 연구에서는 가축의 동결정액 생산을 위하여 손쉽게

수행할 수 있는 간이동결법을 최적화하기 위한 방법을 강구하였다. 가장 흔하게 구입할 수 있는 2종의 스티로폼 박스를 이용하여 최소 동결정액 생산에 활용하여 동결정액 최적화 조건을 탐색하였다. 본 연구의 결과에 따르면, 최소의 정액 동결은 기존에 밝혀진 바와 같이, 질소 표면과 노출되는 스트로의 거리가 5 cm와 10분간 노출시간을 유지하는 것이 우수한 결과를 얻을 수 있었다. 이러한 결과는 이미 보고된 간이동결법을 활용한 성적과 크게 다르지 않았다. 그러나 내부 공간이 23.5×30.5×22.5 cm인 스티로폼 박스의 경우 성적은 전체적으로 낮게 관찰되었으며 정액 동결에 충분하지 않은 크기임을 알 수 있었다.

동결정액을 생산하는데 제한적 사항으로서 스티로폼 박스가 크면 클수록 질소표면의 안정화에 걸리는 시간이 더 많이 필요하다. 박스 내부 공간 비율에 따라 증발하는 질소가스의 양과 공간에 머무르는 냉각 가스의 정지 시간도 서로 다를 것으로 추정되므로 원하는 축종과 동결정액 생산량에 따라 동결상자의 최적화가 필요할 것으로 판단된다. 흥미롭게도, 크기가 25.5×46.5×26.5 cm인 스티로폼박스에서 질소 증기에 노출되는 시간을 조정하면 10분에서 운동성이 가장 우수하였으나, 15분 노출과 유의적 차이가 큰 차이가 존재하지 않았다(67.4%와 65.8%). 이러한 특징은 간이동결법을 활용한 많은 논문에서 축종마다, 심지어 같은 소과 동물에서도 노출되는 높이와 노출시간이 서로 상이하다는 점을 잘 설명해 주고 있고 연구자 마다 선호도가 다를 수 있음을 설명해 준다[13-18].

질소증기에 노출시간을 10분으로 고정하고, 액체질소의 표면과 정액 스트로 사이의 거리를 조정해 보면, 5~7.5 cm 에서는 크기가 다른 두 동결상자에서 모두 차이가 나타나지 않았다. 휘발된 질소 증기가 머무르는 공간이 미치는 영향을 조사하기 위하여 냉각되는 공간을 박스의 높이를 조절하여 변화를 유도하였다. 이 때, 동결정액의 운동성을 조사해 보면, 적절한 높이는 25~30 cm가 되어야 휘발된 질소가스의 열전달이 균일할 것으로 판단되었다. 그러나 30 cm 이상의 깊이에서 스트로를 케인에 보관하는 작업이 용이하지 않으므로 약 25 cm 내외가 적절할 것으로 판단되었다. 또한 동결박스의 내부 공간에 따라 1회당 생산 가능한 최대 생산량을 조사하였을 때, 생산 수량은 차이가 있었으며 작은 형태(23.5×30.5×22.5 cm)의 경우 최대 생산 가능한 스트로 수량이 약 20개 정도 일 것으로 추정되었다. 동결박스의 내부 공간의 크기는 큰 형태(25.5×46.5×26.5 cm)

의 박스가 당연히 동결정액 생산량이 많아질 것으로 판단된다. 그러나 작은 크기 상자는 그림 1 및 2에서 보는 바와 같이 스트로 지지대를 받쳐주는 공간은 좌우 너비가 약 3 cm로서 내부 공간을 차지하고 있어 동결정액 생산량이 더 낮은 것으로 추정되었다. 그러므로 균일한 성적을 얻기 위하여 직사각형의 스티로폼 동결 상자가 동결정액 생산에 보다 효율적일 것으로 판단되며 증발 질소의 냉각 효율성을 위하여 높이가 최소 25 cm 이상의 용기가 적절한 것으로 판단된다. 특히, 동결정액 생산량이 많은 소와 돼지의 경우, 큰 용적의 스티로폼 박스가 필요할 것으로 보이며 더 효율적일 것으로 판단된다.

5. 결론

본 실험을 종합해 보면, 동결 정액을 생산에는 질소 용기가 큰 것이 효율적인 것으로 추정된다. 소 및 돼지의 경우 약 200~300여점이 생산해야 하므로 최소한 2개 이상의 대형 질소상자를 사용하여야 할 것으로 판단된다. 염소나 말의 경우, 50~80개 내외의 정액을 생산할 수 있으므로 1개의 박스로 동결이 가능하다고 판단된다. 정액을 동결하는 시간은 10~15 분이 적절하며 노출 높이는 액체질소 표면에서 5~7.5 cm 거리를 두고 동결해야 한다는 것을 알 수 있었다. 동결상자의 세로 길이에 대한 내부 높이가 중요하며 정액 스트로가 정지되는 위쪽 공간이 어느 정도 충분해야 할 것으로 판단되었다. 또한 축종에 따라 적절한 시간과 동결상자의 깊이를 고려해야 하며, 동결 상자의 깊이는 최소 약 25 cm 이상이 확보되는 용기가 필요할 것으로 판단되며 이때 휘발하는 질소 증기가 머무르는 시간이 충분할 것으로 판단되었다.

References

- [1] M. R. Ugurt, A. S. Abdelrahman, H. C. Evans, A. A. Gilmore, M. Hitit, "Advances in cryopreservation of bull sperm", *Front Vet Sci*, Vol.27, No.6, A268, August 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00268>
- [2] C. M. O. Medeiros, F. Forell, A. T. D. Oliveira, J. L. Rodrigues, "Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?" *Theriogenology*, Vol.57, pp.327-441, January 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00674-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00674-4)
- [3] W. V. Holth, "Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences." *Theriogenology*, Vol.53, No.1, pp.47-58, February 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00239-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00239-3)
- [4] R. V. Devireddy, D. J. Swanlund, K. P. Roberts, J. C. Bichof, "Subzero water permeability parameters of mouse spermatozoa in the presence of extracellular ice and cryoprotective agents." *Biol Reprod*, Vol.61, No.3, pp.764-775, September 1999. DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod61.3.764>
- [5] J. R. Clulow, L. J. Mansfield, L. H. A. Morris, G. Evans, W.M.C. Maxwell, "A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa." *Animal Reprod Sci*, Vol.108, No.3-4, pp.287-287, November 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.08.014>
- [6] G. W. Salisbury, H. K. Fuller, E. L. Willett, "Preservation of bovine spermatozoa in yolk-citrate diluent and field results from its use." *J Dairy Sci*, Vol.24, No.11, pp.905-910, November 1941. DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(41\)95476-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(41)95476-0)
- [7] L. G. Grötter, L. Cattaneo, P. E. Marini, M. E. Kjelland, L. B. Ferré, "Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization." *Reprod Domestic Animals*, Vol.54, No.4, pp.655-665, April 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/rda.13409>
- [8] J. E. APryce, M. D. Royal, P. C. Garnsworthy, I. L. Mao, "Fertility in the high-producing dairy cow." *Livestock Production Science*, Vol.86, No.1-3, pp.125-135, April 2004. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(03\)00145-3](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(03)00145-3)
- [9] P. H. Phillips, H. A. Lardy, "A Yolk-Buffer Pabulum for the preservation of Bull Semen." *J Proceedings of the American Association of Equine Practitioners*, Vol.23, No.5, pp.399-404, May 1940. DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(40\)95541-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(40)95541-2)
- [10] P. R. Loomis, "Factors affecting the success of AI with cooled, transported semen." *Journal of Dairy Science*, Vol.38, pp.629-647, 1993.
- [11] R. A. Forero-Gonzalez, E. C. C. Celeghini, C. F. Raphael, A. F. C. Andrade, F. F. Bressan, "Effects of bovine sperm cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotective agents on plasma, acrosomal and mitochondrial membranes." *Andrologia*, Vol.44, No.5, pp.154-159, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2010.01154.x>
- [12] C. Polge, A. U. Smith, A. S. Parkes, "Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures." *Nature*, Vol.164, pp.666, October 1949. DOI: <https://doi.org/10.1038/164666a0>
- [13] W. M. C. Maxwell, A. J. Landers, G. Evans, "Survival and fertility of ram spermatozoa frozen in pellets, straws and mintubes." *Theriogenology*, Vol.43, pp.1201-1210, May 1995. DOI: [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00092-M](https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00092-M)
- [14] G. C. W. England, W.E. Allen, "Factors affecting the viability of canine spermatozoa. II. Effects of seminal plasma

and blood." *Theriogenology*, Vol.37, pp.373-381, February 1992.

DOI: [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(92\)90195-W](https://doi.org/10.1016/0093-691X(92)90195-W)

- [15] M. Yeste, "State-of-the-art of boar sperm preservation in liquid and frozen state" *Anim Reprod*, Vol.14, pp.69-81, March 2017.
DOI: <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR895>
- [16] H. Rozati, T. Handley, C. Jayasena, "Process and Pitfalls of Sperm Cryopreservation" *J Clinical Medicine*, Vol.6, No.9, A.89, September 2017.
DOI: <https://doi.org/10.3390/jcm609008>
- [17] G. C. Ostermeier, M. V. Wiles, J. S. Farley, R. A. Taft, "Conserving, Distributing and Managing Genetically Modified Mouse Lines by Sperm Cryopreservation." *PLoS ONE*, Vol.3, No.7, e2792, July 2018.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.000279>
- [18] A. Hamada, H. Nagase, "Cryoprotective effects of some amides on rabbit spermatozoa." *J Reprod Fertil*, Vol.60, No.1, 247-252, July 1980.
DOI: <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0600247>

김 성 우(Sung Woo Kim) [정회원]



- 1997년 8월 : 서울대학교 동물자원학과 (농학석사)
- 2002년 2월 : 서울대학교 동물자원학과 (농학박사)
- 1998년 1월 ~ 2002년 6월 : 한국 기초과학연구소 연구원
- 2002년 6월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 연구사

<관심분야>

가축번식학, 생명공학, 동결학

고 응 규(Gyu Yeoung Ko) [정회원]



- 1997년 8월 : 전북대학교 축산학과 (농학석사)
- 2004년 3월 : 동경대학교 수의학과 (수의학박사)
- 1994년 7월 ~ 2015년 7월 : 농촌진흥청 국립축산과학원 연구사
- 2015년 7월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 연구관

<관심분야>

가축번식학, 세포생화학, 생명공학

이 재 영(Jae Yeong Lee) [준회원]



- 2014년 2월 : 명지전문대학 기계과 (전문학사)
- 2017년 2월 : 건국대학교 동물자원학과 (농학사)
- 2019년 9월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 연구사

<관심분야>

가축번식학, 동물면역학, 생명공학

김 찬 란(Chan-Lan Kim) [정회원]



- 1999년 2월 : 서울대학교 수의과대학 수의학과 (수의학학사)
- 2005년 3월 : 일본 기후연합대학원 수의학과 (수의학박사)
- 2006년 7월 ~ 2014년 10월 : 국립축산검역본부 수의연구사
- 2014년 10월 ~ 현재 : 국립축산과학원 수의연구사

<관심분야>

수의학, 예방의학, 친환경

황 인 설(In-Sul Hwang) [정회원]



- 2006년 8월 : 경상대학교 동물자원학과 (농학사)
- 2009년 2월 : 서울대학교 동물자원학과 (농학석사)
- 2013년 9월 : 신수대학교 종합공학계연구과 (농학박사)
- 2017년 2월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 연구사

<관심분야>

바이오이종장기, 복제, 저온생물학