



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0128632
(43) 공개일자 2018년12월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01K 61/13 (2017.01)

(52) CPC특허분류

A01K 61/13 (2017.01)

(21) 출원번호 10-2017-0063983

(22) 출원일자 2017년05월24일

심사청구일자 2017년05월24일

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 신선로 365 (용당동,
부경대학교)

사단법인 대한수산물질병관리사회

부산광역시 서구 원양로 35 ,회관동712호(암남
동, 부산국제수산물도매시장)

(72) 발명자

김도형

부산광역시 남구 수영로 345, 101동 1903호(대연
동, 대연힐스테이트푸르지오)

노형진

부산광역시 북구 금곡대로 228, 103동 502호(화명
동, 동원로알듀크)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인충정

전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 혈액학적 지표를 이용한 무지개송어의 건강도 평가 방법

(57) 요약

본 발명은 무지개송어의 건강 상태 진단 방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 빈산소 스트레스, 수온 스트레스, 과다급이 스트레스 등의 검사 결과값에서 무지개 송어의 이상을 검출하는 방법에 관한 것이다. 이러한 무지개송어의 여러 스트레스 인자 맞춤형 진단을 가능하게 해줌으로써 현재의 무지개 송어의 상태를 정확하게 분석할 수 있을 뿐만 아니라 향후에 예상되는 대량 폐사나 성장불균형 등을 조기에 예방할 수 있는 효과가 있다.

나아가 본 발명에서 제시하는 데이터해석은 무지개송어의 성장에 따른 혈액생화학적 인자들의 변화패턴과 다양한 혈액생화학적 인자의 복합적인 관계가 고려되었기 때문에 복잡한 통계학적 계산이 선행되어야 된다는 단점이 있어, 이를 좀 더 빠르고 쉽게 적용하기 위해 무지개송어 건강성 평가 프로그램을 제작하여 제공하는데 그 의의가 있다.

대표도 - 도1



항목	평균	정상A(90%)	정상B(95%)
Ht(%)	37.6±5.9	29.07~45.19	27.53~46.73
Hb(pg)	5.75±1.27	3.67~7.84	3.27~8.23
RBC#(cell/ml)	9.27±2.2	5.69~10.29	5.00~10.35
MCV(um ²)	414.6±97.4	254.3~574.9	223.6~605.6
MCH(pg)	63.68±15.91	37.57~89.79	32.57~94.79
MCHC(%)	15.80±3.8	9.53~22.06	8.33~23.26

(72) 발명자

김보성

부산광역시 사하구 다대로 339, 1513호(장림동, 극동정립아파트)

강경식

부산광역시 사하구 하신중앙로 170, 104동 1507호(신평동, 신평현대아파트)

김아란

대구광역시 북구 공항로15길 8, 110동 202호(북현동, 북현2차서한타운)

김남은

부산광역시 사하구 승학로281번길 6-6 (괴정동)

유선경

경상남도 양산시 상북면 반희서5길 21, 101동 1306호(진일석계1차아파트)

권정은

경상남도 양산시 물금읍 야리로 90, 307동 1701호(양산 대방노블랜드 연리지(3차))

이윤항

부산광역시 남구 수영로325번길 12, 101동 1904호(대연동, 부산대연동푸르지오)

이현아

경상남도 김해시 분성로 155, 302동 707호(외동, 한국2차아파트)

김민진

부산광역시 남구 용소로13번길 107-4, 201호(대연동, 킹덤빌)

유상준

경기도 남양주시 경춘로1286번안길 19-21, 203호(평내동)

이무근

부산광역시 영도구 영선대로67번길 17, 805호(영선동3가, 더페로스아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20150592

부처명 해양수산부

연구관리전문기관 한국해양과학기술진흥원

연구사업명 수산실용화기술개발사업

연구과제명 양식어류 건강성 신속진단을 위한 기술개발

기 여 율 1/1

주관기관 사단법인 대한수산질병관리사회

연구기간 2017.01.01 ~ 2017.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

- a) 무지개송어 무병어를 확보하는 단계;
- b) 상기 무지개송어 무병어로부터 Hematocrit, RBC count, Hemoglobin 등의 혈액학적 데이터 및 GOT, GPT, ALP, GLU, BUN, TCHO, TP, LDH, Ca 등의 혈액생화학적 데이터를 수집하는 단계;
- c) 상기 측정한 혈액학적 데이터 및 혈액생화학적 데이터를 통해 정상치를 탐색하는 단계;
- d) a)단계의 또 다른 무지개송어 무병어에 대해 스트레스 등으로 환경요인을 변화시켰을 때 혈액학적 데이터 및 혈액생화학적 데이터의 변화를 모니터링하는 단계;
- e) 분석 대상이 되는 무지개 송어의 상기 b) 단계에서 제시한 혈액학적 데이터 및 혈액생화학적 데이터를 수집하는 단계;
- f) 상기 c) 단계에서 얻어진 정상치의 데이터와 상기 e) 단계에서 얻어진 데이터를 비교하여 무지개송어의 이상 여부를 판단하는 단계를 포함하는 무지개송어의 건강성 평가 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 c) 단계에서 얻어진 혈액학적 데이터의 정상치 범주는 하기의 값을 포함하는, 방법.

항목	정상 A(90%)	정상 B(95%)
Ht(%)	29.07~45.19	27.53~46.73
Hb(pg)	3.67~7.84	3.27~8.23
RBC#(cell/ml)	5.69~10.29	5.00~10.35
MCV(um ²)	254.3~574.9	223.6~605.6
MCH(pg)	37.57~89.79	32.57~94.79
MCHC(%)	9.53~22.06	8.33~23.26

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 c) 단계에서 얻어진 혈액생화학적 데이터의 정상치 범주는 하기의 값을 포함하는, 방법.

항목	정상 A(90%)	정상 B(95%)
GOT(U/L)	246~774	195~824
GPT(U/L)	7.79~43.62	4.03~47.08
ALP(U/L)	0~622	0~686
TCHO(mg/dL)	152~426	126~453
TP(g/dL)	3.16~5.27	2.96~5.47
LDH(U/L)	519~3,349	248~3,620
Ca(mg/dL)	9.62~13.26	9.27~13.61
Lysozyme activity	0.42~1.71	0.29~1.83
보체활성	23~325	12~372

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 d) 단계에서의 스트레스는 과다급이, 온도 변화, 빈산소 스트레스인 것을 특징으로 하는 무지개송어의 건강성 평가방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 f) 단계에서의 데이터 비교 결과 TP, ALP, TCHO 값이 증가한 경우 과다급이 스트레스에 따른 질병으로 판단하는 것을 특징으로 하는 무지개송어의 건강성 평가방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 f) 단계에서의 데이터 비교 결과 LDH, GOT, GPT 값이 증가한 경우 온도스트레스 또는 빈산소 스트레스에 따른 질병으로 판단하는 것을 특징으로 하는 무지개송어의 건강성 평가방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 b) 단계에서의 GOT, GPT, TCHO, TP 값이 어체중과 양의 상관관계가 있는 것을 특징으로 하는 무지개송어의 건강성 평가방법.

청구항 8

컴퓨터에서 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 기재된 각 단계를 실행시키기 위한 컴퓨터 판독이 가능한 기록매체에 저장된 컴퓨터 프로그램.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 무지개송어의 건강 상태 진단 방법에 관한 것이다. 보다 상세히 서술하면 빈산소 스트레스, 수온 스트레스, 과다급이 스트레스 등의 검사 결과값에서 무지개 송어의 이상을 평가하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 식료 자원으로서의 어류는 세계적으로 감소하는 경향에 있을 뿐만 아니라 어획량은 크게 변동한다. 따라서 최근의 수산양식산업의 성장이 가속화되고 있다. 양식 기술을 향상시켜 안정된 생산성을 확보하기 위해서는 어류의 건강 상태와 이상 유무를 재빨리 인지하는 것이 필요하다. 현재 양식이 행해지고 있는 예로 해산어에는 방어, 마래미, 자주복, 참돔, 연어와 담수어에는 잉어, 무지개송어, 은어, 장어 등이 있고, 그 생산량은 해마다 증가하는 경향을 나타내고 있다. 특히 우리나라의 수산물 생산은 2005년 270만 톤에서 2010년 311만톤으로 증가하였으며, 이 기간 양식이 차지하는 비율은 2005년 39%에서 2010년 45%로 매년 차이는 있으나 그 비율이 증가하고 있다. 이에 따라 수산생물의 질병을 제어하고 위생적인 수산생물을 생산하는 것은 수산양식업 성패를 좌우하는 전제조건이지만, 최근 수질 악화와 같은 여러 스트레스 요인에 의해 면역력 저하와 질병 발생의 증가로 인해 우리나라 수산양식업은 심각한 어려움을 겪고 있다.
- [0003] 질병에 대한 대처법은 예방과 치료로 대별할 수 있는데, 지금까지 어류 임상에서는 질병 예방법으로 사육환경 소독과 외부 병원성 인자의 차단, 백신 및 면역강화제와 같은 면역학적 제제나 영양보조제의 적용이 대부분이며, 치료법도 육상의 고등동물에 비하여 그 다양성이 매우 결여되어 있고, 항생제 및 구충제 투여가 치료법의 대부분을 차지한다.
- [0004] 이러한 질병의 예방 및 치료법은 거의 모두 원인체 제어에 역점을 두고 있는 실정이며 다양한 원인체 대처법이 개발되고 있는데도 불구하고 새로운 병원성 인자가 출현하거나 기존의 병원체가 복합감염의 형태로 나타나 대규모 폐사피해가 나타나는 등 아직 질병발생 수, 종류 및 폐사로 인한 경제적 피해가 줄지 않고 있어 보다 효과적인 질병 예방 및 대처법이 요구되는 실정이다.
- [0005] 나아가 기존의 원인 병원체 위주의 수산생물질병의 대처법에서 벗어나 숙주의 건강성을 평가하고 건강성을 향상시키는 수산생물질병 예방법으로 전환해야할 필요성이 최근 대두되고 있다. 이러한 필요성에 비해 국내 주요 양식어류의 건강도를 나타낼 수 있는 표준화된 방법 등의 연구 부족으로 양식개발에 어려움이 있다. 이에 따라 인체의 건강검진 정상범위처럼 양식어류도 건강성의 정도를 판단할 수 있는 생물학적 지표의 정상범위 기준치를 마련하고, 생물학적 지표들의 분석법 매뉴얼화 및 정상범위 구축을 통해 새로운 기준안 마련이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0006] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2015-0176870호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명의 목적은 무지개송어의 건강성의 정도를 판단할 수 있는 생물학적 지표의 정상범위 기준치를 마련하고, 이에 따라 신속하게 무지개송어의 이상여부를 판단할 수 있는 방법을 제공하는 데에 있다.
- [0008] 구체적으로 무병어 무지개송어의 혈액학적 데이터 및 혈액생화학적 데이터의 정상치를 탐색하고 빈산소 스트레스, 수온 스트레스, 과다급이 스트레스 등의 실험 결과 이러한 데이터의 변화양상을 모니터링 한다. 이를 바탕으로 변화된 인자와 스트레스 간의 상관관계를 통하여 무지개송어의 질병의 원인을 판단할 수 있는 방법을 제공하고자 한다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 상시 혈액학적 검사를 바탕으로 어류의 정상여부를 신속하게 판단할 수 있는 프로그램을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기의 목적을 달성하기 위하여 a) 무지개송어 무병어를 확보하는 단계; b) 상기 무지개송어 무병어로부터 Hematocrit, RBC count, Hemoglobin 등의 혈액학적 데이터 및 GOT, GPT, ALP, GLU, BUN, TCHO, TP, LDH, Ca 등의 혈액생화학적 데이터를 수집하는 단계; c) 상기 측정된 혈액학적 데이터 및 혈액생화학적 데이터를 통해 정상치를 탐색하는 단계; d) 상기 a)단계의 또 다른 무지개송어 무병어에 대해 스트레스 등으로 환경요인을 변화시켰을 때 혈액학적 데이터 및 혈액생화학적 데이터의 변화를 모니터링하는 단계; e) 분석 대상이 되는 무지개 송어의 상기 b) 단계에서 제시한 혈액학적 데이터 및 혈액생화학적 데이터를 수집하는 단계; f) 상기 c) 단

계에서 얻어진 정상치의 데이터와 상기 e) 단계에서 얻어진 데이터를 비교하여 무지개송어의 이상여부를 판단하는 단계를 포함하는 무지개송어의 건강성 평가 방법을 제공한다.

[0011] 상기 c) 단계에서 얻어진 혈액학적 데이터의 정상치 범주는 하기의 값에 해당한다.

항목	정상 A(90%)	정상 B(95%)
Ht(%)	29.07~45.19	27.53~46.73
Hb(pg)	3.67~7.84	3.27~8.23
RBC#(cell/ml)	5.69~10.29	5.00~10.35
MCV(um ²)	254.3~574.9	223.6~605.6
MCH(pg)	37.57~89.79	32.57~94.79
MCHC(%)	9.53~22.06	8.33~23.26

[0012]

[0013] 또한 상기 c) 단계에서 얻어진 혈액생화학적 데이터의 정상치 범주는 하기의 값에 해당한다.

항목	정상 A(90%)	정상 B(95%)
GOT(U/L)	246~774	195~824
GPT(U/L)	7.79~43.62	4.03~47.08
ALP(U/L)	0~622	0~686
TCHO(mg/dL)	152~426	126~453
TP(g/dL)	3.16~5.27	2.96~5.47
LDH(U/L)	519~3,349	248~3,620
Ca(mg/dL)	9.62~13.26	9.27~13.61
Lysozyme activity	0.42~1.71	0.29~1.83
보체활성	23~325	12~372

[0014]

[0015] 상기 d)단계에서의 스트레스는 과다 급이, 온도 변화, 빈산소 인 것을 특징으로 한다.

[0016] 또한 상기 f)단계에서의 데이터 비교 결과 TP, ALP, TCHO 값이 증가한 경우 과다급이 스트레스에 따른 질병으로 판단하는 것을 특징으로 하며 비교결과 LDH, GOT, GPT 값이 증가한 경우에는 온도 또는 빈산소 스트레스에 따른 질병으로 판단하는 것을 특징으로 한다.

[0017] 나아가 상기 b)단계에서의 GOT, GPT, TCHO, TP는 어체중과 양의 상관관계가 있는 것을 특징으로 한다.

[0018] 다른 한편으로 컴퓨터에서 상기 기재된 각 단계를 실행시키기 위한 컴퓨터 판독이 가능한 기록매체에 저장된 컴퓨터 프로그램을 제공하고자 한다.

발명의 효과

[0019] 본 발명은 무엇보다 다양한 혈액학적 기준 등에 대한 통계학적 분석을 통하여 무지개송어의 이상여부를 신속, 정확하게 판단하는 효과가 있다. 이러한 조기 진단은 어류의 집단 폐사를 방지하여 양식생산량을 증가시키고 질 좋은 무병어를 양식하므로 국민의 소비심리에도 긍정적인 영향을 끼쳐 위축된 국내 경제를 활성화 시키는 긍정적 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 무지개송어의 혈액학적 바이오마커에 대한 정상치를 탐색한 표이다.

도 2는 무지개송어의 혈액생화학적 바이오마커에 대한 정상치 탐색을 나타낸 표이다.

도 3은 에어차단 후 시간 경과에 따른 사육수내 용존산소량을 측정한 그래프이다.

도 4는 빈산소 스트레스에 따른 혈액학적 인자에 대한 모니터링을 한 표이다.

- 도 5는 수온 상승 후 10, 20, 30, 60, 120 분 뒤의 사육수의 수온 변화정도를 나타낸 그래프이다.
- 도 6은 고수온 스트레스에 따른 혈액학적 인자에 대한 모니터링을 한 표이다.
- 도 7은 과다급이 실험 중 무지개송어의 만복급이 사료량을 나타낸 그래프이다.
- 도 8은 만복급이에 따른 무지개 송어의 혈액학적 인자의 발현정도를 나타낸 표이다.
- 도 9는 Control, 과급이, 빈산소, 온도 스트레스에 따른 GOT, GPT, LDH, BUN 값의 변화 모니터링을 한 그래프이다.
- 도 10은 Control, 과급이, 빈산소, 온도 스트레스에 따른 ALP, TCHO, TP, GLU, Ca 값의 변화 모니터링을 한 그래프이다.
- 도 11은 GLU, TP, ALP, TCHO, Ca, LDH, GOT, GPT 값에 대한 상관관계를 나타낸 heatmap 이다.
- 도 12는 PCA 분석을 위한 공분산 행렬, 표분분산-공분산 행렬, Eigenvalues of the Covariance matrix, Eigenvectors를 나타낸 행렬 표이다.
- 도 13은 PCA 분석을 통한 각 항목별 벡터 방향을 나타낸 그래프이다.
- 도 14는 정상(Control), 과급이, 빈산소, 고수온 스트레스에 대한 dot plot을 나타낸 그래프이다.(둥근 점 = 초기 스트레스, 세모 점 = 중, 후기 스트레스 자극)
- 도 15는 Control(정상개체), 과급이, 빈산소, 온도 스트레스 자극에 따른 분포를 나타낸 그래프이다.
- 도 16은 현장 샘플링이 진행된 무지개 송어의 양식장 위치를 나타낸 사진이다.
- 도 17은 무지개송어의 성장에 따른 혈액생화학적 인자(GOT, GPT, TCHO, TP) 상관관계 및 이에 따른 증가 함수를 나타낸 표이다.
- 도 18은 무지개송어 건강성 평가 프로그램 사용 실시의 예를 나타낸 사진이다.
- 도 19는 실험실 과다급이 실험 결과를 TP-ALP 그래프에 대입(왼쪽 그래프), 현장에서 비감염어에 대해 TP-ALP plot 적용한 그래프이다.
- 도 20은 무지개송어의 선별예보시스템을 각 양식장별로 적용 및 활용가능성을 검증한 그래프이다.
- 도 21은 우리나라 수산물 생산량과 양식이 차지하는 비율의 변동 추이를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 이하, 본 발명을 실시 예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시 예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시 예에 한정되는 것은 아니다.
- [0023] 1. 실험대상 무지개송어 무병어 확보
- [0024] 1) 충북 충주시 소재의 달천 양식장에서 무지개송어(80-150g)을 구매하여, 실험실 내 500 리터 사육조에 15℃의 수온으로 1주일 이상 순치시켰으며 매일 어체중의 1%의 사료를 공급하여 정상적인 상태의 무지개송어를 유지한다.
- [0025] 2) 샘플링하기 하루전날은 절식을 실시하여 사료섭이에 따른 여러 혈액/면역학적 인자의 오차를 줄였으며, 샘플링시 아가미와 피부를 생검하여 기생충 감염여부를 확인하였고, 비장의 체액을 BHIA(Brain Heart Infusion Agar)에 접종하여 세균감염여부를 확인했으며 L-15 + 2% FBS 배지에 비장을 갈아서 EPC(Epithelioma papulosum cyprini) cell line에 접종하여 CPE(Cytopathic effect)의 확인으로 바이러스 감염여부를 확인했다. 감염성 질병(기생충/세균/바이러스)에 감염되지 않았으며, 총 36마리의 정상개체를 확보하여 분석을 진행하였다.
- [0026] 3) 샘플링은 전혈을 채혈하여 Heparin 처리 또는 Sodium citrate 처리를 하여 실험을 진행하였다.
- [0028] 2. 정상범위 도출을 위한 통계학적 분석방법

- [0029] 1) 측정된 결과는 통계학적으로 정규분포를 형성하는지 확인하기 위해 정규 P-P 도표를 작성했으며, Kolmogorov-Smirnov 와 Shapiro-Wilk 정규성 검정법을 이용하여, 유의확률 0.05 이상일 때 해당 측정항목이 정규분포를 따르고 있다고 판단하였다.
- [0030] 2) 정규분포를 따르고 있다고 판단되는 항목에 대해서는 정규분포 히스토그램과 곡선을 그렸으며, 확률밀도함수로 변환하여 정상개체 범위의 90%를 정상 A로 정상개체 범위의 95%를 정상 B의 범위로 가정하여 정상치를 도출하였다.
- [0031] 3) 또한, 여러 기술 통계학적 분석을 도입하여 각 항목에 대한 평균, 모평균의 추정을 위한 구간 추정(Interval Estimation) 5% 절삭평균, 중위수, 분산/표준편차, 최소값, 최대값, 범위, 사분위수 범위, 왜도, 첨도 등을 계산하여 나타내었다.
- [0032] 4) 각 항목에 대한 상관관계를 분석하기 위해 Spearman-rho 분석방법을 이용한 상관관계 검정을 실시했으며 유의확률 0.05 이하일 때 유의적인 관계가 있다고 판단하였다.
- [0034] **3. 혈액학적 바이오마커의 정상치 탐색**
- [0035] 1) 무지개 송어 Hematocrit
- [0036] 기본적인 혈액학적 정보수집을 위해 Heparinized capillary tube를 이용해서 12,000 rpm 10min의 조건으로 원심분리해서 결과를 측정하였다.
- [0037] 2) 무지개송어 RBC count
- [0038] 기본적인 혈액학적 정보 수집을 위해 Hepainized capillary tube를 이용해서 12,000 rpm 10min의 조건으로 원심분리해서 결과를 측정하였다.
- [0039] 3) 무지개송어 Hemoglobin
- [0040] Hemoglobin의 측정은 Sigma Hemoglobin assay kit(Sigma:USA)를 이용해 실험이 진행되었으며, 제작사의 매뉴얼에 따라 분석하였다.
- [0041] 4) 무지개송어 MCV(Mean Corpuscular Volume)
- [0042] MCV의 측정은 기존의 RBC count와 Hematocrit치의 데이터를 이용하여, 아래의 공식과 같이 정리하였다. 여기에 서 평균 적혈구 용적(μm^3) = (Hematocrit(%) / RBC count as million unit) * 10을 의미한다.
- [0043] 5) 무지개송어 MCH(Mean Corpuscular Hemoglobin)
- [0044] MCH의 측정은 기존의 RBC count와 Hematocrit치의 데이터를 이용하여, 아래의 공식과 같이 정리하였다. 여기에 서 평균 적혈구 혈액소량(μm^3) = (Hemoglobin(g/dl) / RBC count as million unit) * 10을 의미한다
- [0045] 6) 무지개송어 MCHC(Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration)
- [0046] MCHC의 측정은 기존의 RBC count 와 Hematocrit 치의 데이터를 이용하여 아래의 공식과 같이 정리하였다. 평균 적혈구 혈액소농도(%) = (Hemoglobin(g/dl) / Hematocrit(%)) * 100을 의미한다.
- [0047] 나아가 상기의 각 항목에 대한 정상기준치는 도 1에 나타내었다.
- [0049] **4. 혈액생화학적 바이오마커의 정상치 탐색**
- [0050] 1) 정상 무지개송어개체의 plasma를 건식생화학 혈액분석기(Fuji-drichem 4000)를 이용하여 GOT, GPT, ALP, GLU, BUN, TCHO, TP, LDH, Ca 값을 분석하였다.
- [0051] 2) 이에 대한 혈액생화학적 바이오마커의 정상 기준치를 도 2에 나타내었다.
- [0053] **5. 혈액학적 바이오마커의 특성 확인**

[0054] (1) 급성 빈산소 스트레스에 따른 혈액학적 인자 변화 모니터링

[0055] 1) 무지개송어의 급성 빈산소 스트레스에 따른 혈액학적 인자의 변화를 모니터링 하기 위해 2개의 0.5 ton 사육수조에 각각 15마리씩 1주일간 순치한 뒤, 에어공급을 차단해줌으로써 급성 빈산소 스트레스를 유발시켰다. (도 3)

[0056] 2) 이후 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150분 후에 용존산소량(DO: Disolved Oxygen)을 측정하였다. 지속적인 에어공급시에 사육수의 DO 농도는 8mg/l 이상이였으나 에어를 1 시간 차단한 뒤에 사육수의 농도는 4mg/l 정도였으며, 150분 뒤에는 2mg/l로 까지 떨어지는 것을 확인하였다. 무지개송어의 샘플링 시점은 DO농도가 4mg/l로 떨어지는 시점에 한번, DO 농도가 2mg/l로 떨어지는 시점에 한 번 더 샘플링(n=10)을 실시하여 이전에 실시된 방법과 동일하게 혈액학적 인자들의 변화를 모니터링 했으며 그 결과를 도 4에 나타내었다. (도 4)

[0057] 3) 그 결과 혈액내 RBC 수와 GPT, LDH의 값이 유의적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0059] (2) 급성 고수온 스트레스에 따른 혈액학적 인자 변화 모니터링

[0060] 1) 무지개송어의 급성 고수온 스트레스에 따른 혈액학적 인자의 변화를 모니터링 하기 위해 사육수의 수온을 15℃에서 25℃로 30분 만에 상승시킨 뒤 4, 24, 72, 240시간 뒤에 혈액학적 인자들의 변화를 확인하였으며(도 5) 대조구는 온도스트레스를 주지 않은 상태의 무지개송어를 이용하여 동일한 시점에 샘플링을 실시하였다.(n=5)

[0061] 2) 온도 스트레스 이후에 GOT, GPT, LDH에 대한 값이 유의적으로 변화하는 것을 관찰할 수 있었으며 특히 72시간 뒤에 그 변화가 매우 두드러지게 나타났으며 GOT, GPT, LDH가 온도스트레스에 상대적으로 민감하게 반응한다는 것을 확인할 수 있었다. (도 6)

[0063] (3) 급성/만성 과다급이에 따른 혈액학적 인자 변화 모니터링

[0064] 1) 무지개송어의 과다급이에 따른 혈액학적 변화인자들을 모니터링하기 위해 상업용 사료를 무지개송어가 반복으로 급이할 때 까지 계속 공급하였으며 매일매일 먹은 사료의 양을 확인하여 도 7에 나타내었다.(도 7)

[0065] 2) 또한 반복급이 실험 진행 후 1, 2, 4, 8주 뒤에 혈액학적 인자들의 변화정도를 모니터링 했으며 그 결과를 도 8에 나타내었다. (도 8)

[0066] 3) 그 결과 여러 혈액학적 인자들이 변화했지만 ALP, GLU, TCHO, TP값이 두드러지게 증가하는 결과를 확인할 수 있었다.

[0068] (4) 빈산소, 온도스트레스, 과다급이에 따른 혈액생화학적 발현 비교

[0069] 1) 다양한 스트레스 인자에 따른 여러 혈액생화학적 인자에 대한 발현차이와 본 발명에서 제시한 정상 기준치(95%)가 얼마나 잘 일치하는지 확인하기 위해, 각각의 항목(Control, 과급이 1W, 과급이 2W, 과급이 4W, 과급이 8W, 빈산소 DO-2, 빈산소 DO-4, 온도 stress(0d-4h), 온도 stress(1d), 온도 stress(3d), 온도 stress(10d) group에 대한 box plot을 그리고 정상 기준치를 y축에 점선으로 표기하여 GOT, GPT, LDH, BUN 값을 도 9에 ALP, TCHO, TP, GLU, Ca를 도 10에 나타내었다.

[0070] 2) 도 9에서와 같이 GOT, GPT, LDH 값 모두 control의 경우 정상범위 내에 들어가는 것을 확인할 수 있었지만 빈산소 스트레스(DO-2), 온도스트레스(24, 72, 240h)에서는 해당 수치의 발현양이 유의적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다. (도 9)

[0071] 3) 도 10에서와 같이 ALP, TCHO, TP값이 control의 경우 정상범위 내에 들어가는 것을 확인할 수 있었지만 과다급이 스트레스에서는 해당 수치의 발현양이 유의적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다. (도 10)

[0072] 4) 또한, 각 혈액학적 생화학인자들에 대한 이해를 돕기 위해 상관관계 분석을 진행하여 heatmap으로 도 11에 나타내었다. (도 11)

[0073] 5) 그 결과 TP-ALP-TCHO간에 강한 상관관계가 있는 것으로 확인 되었으며 LDH-GOT-GPT간에 강한 상관관계가 있는 것을 확인하였다. 또한 여러 스트레스에 따른 혈액생화학적 발현 모니터링 결과 TP-ALP-TCHO는 영양성 질병

(과다급이)를 확인할 수 있는 바이오마커로 판단되며 LDH-GOT-GPT의 경우 급성/만성 온도스트레스, 빈산소 스트레스 기타 질병 감염을 확인할 수 있는 바이오마커로 판단할 수 있다.

[0075] 6. 탐색한 혈액학적 바이오마커에 대한 새로운 기준치 제시

[0076] 1) 본 연구에서 여러 혈액생화학적 인자를 통합하여 건강성 평가를 진행할 수 있도록 하기 위해 주성분 분석(Principal Analysis)을 실시하여 새로운 벡터값을 도출했으며, 자세한 사항은 도 12에 나타내었다. (도 12)

[0077] 2) 나아가 도출된 component 1(comp 1) 과 component 2(comp 2)에 대한 그림을 작성하여 도 13에 나타내었다. (도 13)

[0078] 3) 그 결과 LDH, GOT, GPT 같은 방향의 벡터를 TCHO, TP, GLU, ALP가 같은 방향의 벡터를 가지는 것으로 확인하였다. 해당 결과를 바탕으로 각 항목에 대한 component 1 과 component 2를 아래와 같이 구하였다.

[0079]
$$\text{vector component 1(V comp 1)} = (0.398 \times \text{V GOT} + 0.389 \times \text{V GPT} - 0.429 \times \text{V ALP} - 0.148 \times \text{V GLU} - 0.435 \times \text{V TCHO} - 0.367 \times \text{V TP} + 0.38 \times \text{V LDH} + 0.126 \times \text{V Ca})$$

[0080]
$$\text{vector component 2(V comp 2)} = (0.437 \times \text{V GOT} + 0.47 \times \text{V GPT} + 0.378 \times \text{V ALP} + 0.183 \times \text{V GLU} + 0.376 \times \text{V TCHO} + 0.356 \times \text{V TP} + 0.367 \times \text{V LDH})$$

[0081] 4) 상기 vector component 1 및 vector component 2를 사용하여 모든 무지개송어의 혈액생화학적 성상을 분석하였다. (도 14) 그 결과 정상개체, 과급이 스트레스, 고수온 스트레스, 빈산소 스트레스가 정상과 다른 분포에 해당되는 것을 확인하였으며 좀 더 자세한 내용에 대하여는 도 15에 나타내었다. (도 15)

[0082] 5) 도출된 결과치를 바탕으로 component 1의 기준치를 220으로 component 2의 기준을 1850으로 하여 데이터를 분석하였으며 이를 도 15에 나타내었다. 도 15에서와 같이 정상 개체가 plot A에 포함될 확률은 97.14%로 매우 높았지만 과급이 자극시에는 초기에 54.55%, 후기에는 0%가 포함되었으며 초기와 후기 빈산소 스트레스 자극시에는 각각 70%, 30% 정도가 포함되었다. 그리고 고수온 스트레스 역시 초기에는 60%가 plot A에 포함되어 있었지만 후기에는 10%만 포함되는 결과를 확인할 수 있었다. plot C의 경우 과급이 스트레스가 진행되었을 때만 특이적으로 해당분포를 가지는 것으로 확인했으며, plot B의 경우 고온과 빈산소 스트레스 진행시에 해당분포를 가지는 것으로 확인되었다.

[0083] 또한 성장에 따른 각 혈액학적 인자의 기준치가 변동할 수 있기 때문에 실제 무지개송어 양식장 4곳을 방문하여 총 220마리의 무지개송어를 봄/여름/가을/겨울에 다양한 크기의 무지개송어를 샘플링 하여 성장에 따른 혈액생화학적 성상의 변화가능성을 확인하였으며, 220마리의 무지개송어 중 세균/기생충/바이러스 검사 및 병리조직검사를 진행하여 큰 이상이 없다고 판단되는 100마리의 무지개 송어만을 이용하여 데이터를 분석하였다.

[0084] 샘플링 한 무지개송어 양식장의 위치를 도 16에 나타내었다. 그 결과 도출된 무지개송어의 혈액생화학적 성상 데이터와 무계별 상관관계를 확인하였으며, GOT, GPT, TCHO, TP는 어체중이 증가함에 따라서 정상이라고 판단되는 무지개송어의 혈액생화학적 수치도 조금 증가인자라고 확인 되었으며 그 관계를 도 17에 나타내었다.(도 17) 향후 건강성 평가를 진행함에 있어서 도 17에서와 같이 성장에 따른 GOT, GPT, TP, TCHO와 어체중과의 상관관계를 적용시켜 건강성 평가를 진행하는 것이 합리적일 것으로 생각된다.

[0086] 7. 탐색한 바이오마커의 적용 프로그램 제작

[0087] 본 발명에서 제시하는 데이터해석은 무지개송어의 성장에 따른 혈액생화학적 인자들의 변화 패턴과 다양한 혈액생화학적 인자의 복합적인 관계가 고려되었기 때문에 복잡한 계산이 선행되어야 된다는 단점이 있어, 이를 좀 더 빠르게 적용하기 위해 무지개송어 건강성 평가 프로그램을 파이썬 3.6(python 3.6)언어를 사용하여 프로그램을 작성했으며, 해당 프로그램의 코딩을 아래와 같이 진행하였으며, 실시예를 도 18에 나타내었다.

[0089] `from tkinter import *`

[0090] `class App:`

[0091] `def __init__(self,r):`

[0092] frame=Frame(r)

[0093] frame.pack()

[0095] Label(frame, text='GOT').grid(row=0,column=0)

[0096] self.c_var=DoubleVar()

[0097] Entry(frame,textvariable=self.c_var).grid(row=0,column=1)

[0099] Label(frame, text='GPT').grid(row=1,column=0)

[0100] self.c_var2=DoubleVar()

[0101] Entry(frame,textvariable=self.c_var2).grid(row=1,column=1)

[0103] Label(frame, text='ALP').grid(row=2,column=0)

[0104] self.c_var3=DoubleVar()

[0105] Entry(frame,textvariable=self.c_var3).grid(row=2,column=1)

[0107] Label(frame, text='GLU').grid(row=3,column=0)

[0108] self.c_var4=DoubleVar()

[0109] Entry(frame,textvariable=self.c_var4).grid(row=3,column=1)

[0111] Label(frame, text='TCH0').grid(row=4,column=0)

[0112] self.c_var5=DoubleVar()

[0113] Entry(frame,textvariable=self.c_var5).grid(row=4,column=1)

[0115] Label(frame, text='TP').grid(row=5,column=0)

[0116] self.c_var6=DoubleVar()

[0117] Entry(frame,textvariable=self.c_var6).grid(row=5,column=1)

[0119] Label(frame, text='LDH').grid(row=6,column=0)

[0120] self.c_var7=DoubleVar()

[0121] Entry(frame,textvariable=self.c_var7).grid(row=6,column=1)

[0123] Label(frame, text='Ca').grid(row=7,column=0)

[0124] self.c_var8=DoubleVar()

[0125] Entry(frame,textvariable=self.c_var8).grid(row=7,column=1)

```

[0127] Label(frame, text='').grid(row=8,column=0)

[0129] Label(frame, text='어체중').grid(row=9,column=0)
[0130] self.c_var9=DoubleVar()
[0131] Entry(frame,textvariable=self.c_var9).grid(row=9,column=1)

[0133] Label(frame, text='').grid(row=10,column=0)
[0134] Label(frame, text='계산결과').grid(row=11,column=0)

[0136] self.result=DoubleVar()
[0137] Entry(frame,textvariable=self.result).grid(row=11,column=1)
[0138] button=Button(frame,text='감염/급성자극 계산',command=self.convert)
[0139] button.grid(row=12,column=1)
[0140] Label(frame, text='감염/급성자극 계산 정상 기준 1850 이하').grid(row=13,column=1)
[0141] button=Button(frame,text='과다급이 계산',command=self.ofconvert)
[0142] Label(frame, text='').grid(row=14,column=0)
[0143] button.grid(row=15,column=1)
[0144] Label(frame, text='과다급이 계산 정상 기준 220 이상').grid(row=16,column=1)

[0146] def convert(self):
[0147]     GOT=self.c_var.get()
[0148]     GPT=self.c_var2.get()
[0149]     ALP=self.c_var3.get()
[0150]     GLU=self.c_var4.get()
[0151]     TCHO=self.c_var5.get()
[0152]     TP=self.c_var6.get()
[0153]     LDH=self.c_var7.get()
[0154]     Ca=self.c_var8.get()
[0155]     w=self.c_var9.get()
[0156]     CalGOT=GOT+0.4257*(83-w)
[0157]     CalGPT=GPT+0.0017*(83-w)
[0158]     CalTCHO=TCHO+0.2536*(83-w)
[0159]     CalTP=TP+0.0017*(83-w)
[0160]
[0161]     print (0.437*CalGOT+0.470*CalGPT+0.378*ALP+0.183*GLU+0.376*CalTCHO+0.356*CalTP+0.367*LDH)
[0162]     self.result.set(0.437*CalGOT+0.470*CalGPT+0.378*ALP+0.183*GLU+0.376*CalTCHO+0.356*CalTP+0.367*LD

```

H)

```
[0164]         def ofconvert(self):
[0165]             GOT=self.c_var.get()
[0166]             GPT=self.c_var2.get()
[0167]             ALP=self.c_var3.get()
[0168]             GLU=self.c_var4.get()
[0169]             TCHO=self.c_var5.get()
[0170]             TP=self.c_var6.get()
[0171]             LDH=self.c_var7.get()
[0172]             Ca=self.c_var8.get()
[0173]             w=self.c_var9.get()

[0175]
[0176]             print(0.398*GOT+0.389*GPT-0.429*ALP-0.148*GLU-0.435*TCHO-0.367*TP+0.38*LDH+0.126*Ca,self)
[0177]             self.result.set(0.398*GOT+0.389*GPT-0.429*ALP-0.148*GLU-0.435*TCHO-0.367*TP+0.38*LDH+0.126*Ca)

[0179]         root=Tk()
[0180]         root.wm_title('copyrighted by 형진^^')
[0181]         Label(root, text="무지개송어 건강성 평가 프로그램 v1.2 ").pack()
[0182]         root.geometry("400x400")
[0183]         app=App(root)
[0184]         Label(root, text=" ").pack()
[0185]         button2=Button(root, text="종료하기", command=quit)
[0186]         button2.pack()
[0187]         root.mainloop()
```

[0189] 상기 프로그래밍 소스는 무지개송어의 혈액학적 건강성 평가 기준을 통한 어류의 건강성 평가를 위한 프로그램이다. 각 혈액학적 항목에 대한 기준치 제시를 통하여 사람과 같은 건강검진 결과를 분석할 수 있어 매우 용이하다.

[0190] 도 18에 기재된 실시 예와 같이 혈액학적 항목과 어체중만 넣게 되면, 해당 결과를 산출해서 나타내어 주고 이를 통해 양식어민이나 수산질병관리사, 수의사가 현재 상태를 확인할 수 있어 향후에 많은 사용이 예상된다.

[0191] 도 19는 무지개송어의 특정 혈액생화학적 특성과 계군분석을 통한 어류선별 예보시스템에 대한 것이다. 구체적으로 무지개송어의 과급이시 특정 혈액학적 항목(ALP, TCHO, TP, GLU)들의 발현이 증가하는 것에 착안하여 과급이한 어류와 그렇지 않은 어류와의 계군분석을 통한 조기 선별 예보 분석을 나타낸 것이다.(도 19) 그 결과 현장의 비감염어에서도 과다급이로 의심되는 어류가 많이 발견 되었고 이는 어류의 건강저하, 사료효율의 감소로 이어 질 수 있어 빠른 예방이 중요하다.

[0192] 또한 선별 예보시스템을 각 양식장별로 적용하여 도 20에 나타내었다. 그 결과 16KR11, 16KR21, 16KR22 양식장

의 경우 고른 분포를 보여주어 양식 어류가 잘 관리되고 있음을 확인할 수 있었으나 16KR23, 16KR32, 16KR33 등의 양식장은 상대적으로 불량한 분포를 보여주어 빠른 시일 내에 선별이 필요할 것으로 분석된다.

[0193] 본 연구에서 제시한 계군분석방법이 실험실내에서만 통용되는 것이 아니라 현장에서 적용이 가능함이 현장 검증을 통해 확인되었고 이러한 적용은 현재 사육자의 직관에 의존하고 있는 무지개송어의 양식을 좀 더 과학에 근거하여 체계적으로 산업화 하는데 큰 도움을 줄 것으로 판단된다.

도면

도면1



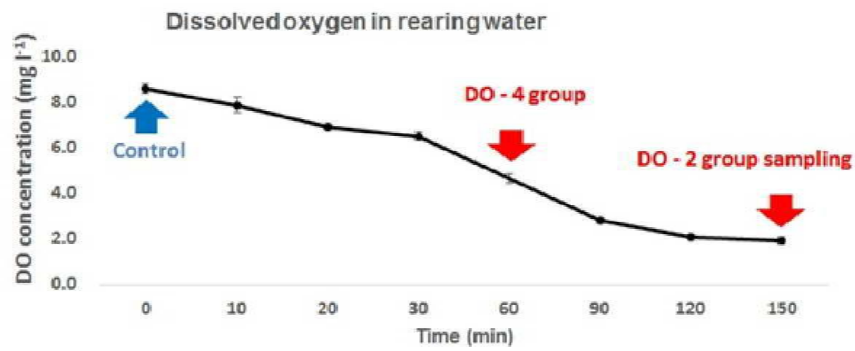
항목	평균	정상A(90%)	정상B(95%)
Ht(%)	37.6 ± 5.9	29.07~45.19	27.53~46.73
Hb(pg)	5.75 ± 1.27	3.67~7.84	3.27~8.23
RBC#(cell/ml)	9.27 ± 2.2	5.69~10.29	5.00~10.35
MCV(um ²)	414.6 ± 97.4	254.3~574.9	223.6~605.6
MCH(pg)	63.68 ± 15.91	37.57~89.79	32.57~94.79
MCHC(%)	15.80 ± 3.8	9.53~22.06	8.33~23.26

도면2



항목	평균	정상A(90%)	정상B(95%)
GOT (U/L)	510 ± 160.15	246~774	195~824
GPT (U/L)	25.56 ± 10.98	7.79~43.62	4.03~47.08
ALP (U/L)	290 ± 202.07	0~622	0~686
BUN(mg/dL)	2.14 ± 0.59	-	-
GLU(mg/dL)	91.3 ± 26.23	-	-
TCHO(mg/dL)	289 ± 83.31	152~426	126~453
TP (g/dL)	4.22 ± 0.64	3.16~5.27	2.96~5.47
LDH (U/L)	1,934 ± 850	519~3,349	248~3,620
Ca (mg/dL)	11.44 ± 1.11	9.62~13.26	9.27~13.61
Lysozyme activity	1.17 ± 0.85 e	0.42~1.71	0.29~1.83
보체활성	146 ± 104 *	23~325	12~372

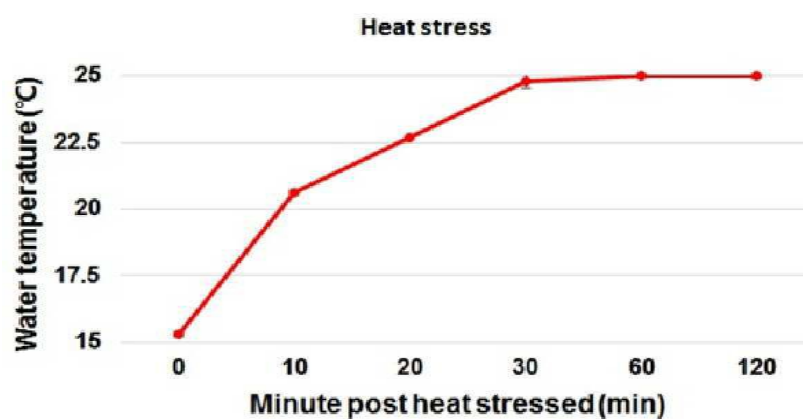
도면3



도면4

DO 분 실험	Control(DO-8)	Hypoxia (DO-4)	Hypoxia (DO-2)
RBC (10 ⁸ cells ml ⁻¹)	7.90 ± 0.94 ^a	10.50 ± 2.4 ^b	9.75 ± 2.12 ^b
Hematocrit (%)	39.2 ± 4.4	42.4 ± 4.2	39.6 ± 6.7
Hemoglobin (g dl ⁻¹)	5.28 ± 1.32	6.07 ± 2.25	6.55 ± 2.31
MCV (μm)	504 ± 83	429 ± 118	418 ± 73
MHC (pg)	68 ± 20	58 ± 14	71 ± 30
MCHC (%)	14 ± 4	15 ± 6	17 ± 7
ESR (%)	96 ± 2	97 ± 3	96 ± 1
GOT (U l ⁻¹)	619 ± 102	698 ± 224	662 ± 167
GPT (U l ⁻¹)	29 ± 6 ^a	36 ± 10 ^{ab}	38 ± 10 ^b
ALP (U l ⁻¹)	243 ± 81	269 ± 124	230 ± 60
BUN (mg dl ⁻¹)	2.34 ± 0.45 ^a	2.91 ± 0.61 ^b	2.41 ± 0.32 ^a
GLU (mg dl ⁻¹)	81 ± 13	97 ± 15	94 ± 43
TCHO (mg dl ⁻¹)	265 ± 39	311 ± 69	260 ± 46
TP (g dl ⁻¹)	4.52 ± 0.41	4.85 ± 0.44	5.11 ± 1.04
LDH (U l ⁻¹)	2230 ± 883 ^a	2942 ± 1435 ^a	5358 ± 2865 ^b
Ca (mg dl ⁻¹)	11.92 ± 1.07	12.28 ± 0.56	12.88 ± 1.92
Lysozyme activity	1.05 ± 0.76	1.23 ± 0.52	1.08 ± 0.81

도면5

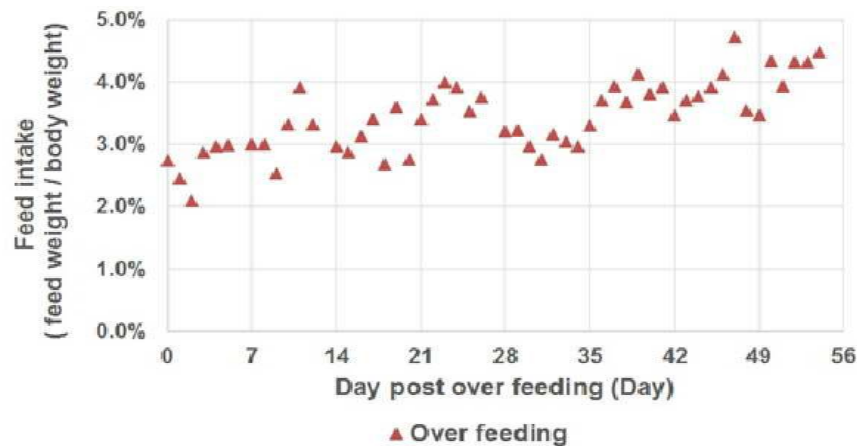


도면6

	4h		24h		72h		240h	
	Con (15°C)	Heat stress (25°C)	Con (15°C)	Heat stress (25°C)	Con (15°C)	Heat stress (25°C)	Con (15°C)	Heat stress (25°C)
RBC (10^6 cells $\cdot$ ml $^{-1}$)	8.18 $\pm$ 0.38	9.76 $\pm$ 2.11	8.94 $\pm$ 1.42	9.58 $\pm$ 1.52	10.01 $\pm$ 0.95	8.40 $\pm$ 2.48	10.13 $\pm$ 1.62	7.28 $\pm$ 2.17 *
Hematocrit (%)	37 $\pm$ 5	39 $\pm$ 6	41 $\pm$ 7	43 $\pm$ 2	34 $\pm$ 2	38 $\pm$ 8	42 $\pm$ 8	41 $\pm$ 8
Hemoglobin (g $\cdot$ dl $^{-1}$)	8.05 $\pm$ 2.82	8.70 $\pm$ 2.79	6.38 $\pm$ 0.52	6.65 $\pm$ 2.29	6.90 $\pm$ 1.22	7.59 $\pm$ 3.19	6.59 $\pm$ 1.36	5.42 $\pm$ 2.01
MCV (μ m)	449 $\pm$ 53	405 $\pm$ 41	457 $\pm$ 62	453 $\pm$ 63	341 $\pm$ 18	475 $\pm$ 117	417 $\pm$ 76	618 $\pm$ 238
MHC (pg)	97 $\pm$ 31	92 $\pm$ 30	72 $\pm$ 8	68 $\pm$ 14	69 $\pm$ 15	92 $\pm$ 35	65 $\pm$ 6	75 $\pm$ 24
MCHC (%)	21 $\pm$ 6	23 $\pm$ 8	16 $\pm$ 2	15 $\pm$ 5	20 $\pm$ 3	20 $\pm$ 6	16 $\pm$ 4	14 $\pm$ 7
HIS (%)	0.85 $\pm$ 0.12	0.98 $\pm$ 0.20	0.84 $\pm$ 0.18	0.81 $\pm$ 0.03	0.83 $\pm$ 0.10	0.86 $\pm$ 0.07	0.70 $\pm$ 0.08	1.04 $\pm$ 0.21 *
ESR (%)	96 $\pm$ 1	96 $\pm$ 0	96 $\pm$ 1	96 $\pm$ 1	96 $\pm$ 0	96 $\pm$ 1	97 $\pm$ 1	93 $\pm$ 3 *
GOT (U $\cdot$ l $^{-1}$)	578 $\pm$ 145	558 $\pm$ 116	553 $\pm$ 131	769 $\pm$ 193	506 $\pm$ 46	4147 $\pm$ 1346 ***	598 $\pm$ 63	2342 $\pm$ 1379 *
GPT (U $\cdot$ l $^{-1}$)	31 $\pm$ 8	36 $\pm$ 18	27 $\pm$ 5	69 $\pm$ 37 *	31 $\pm$ 17	817 $\pm$ 477 **	34 $\pm$ 8	235 $\pm$ 274
ALP (U $\cdot$ l $^{-1}$)	162 $\pm$ 97	142 $\pm$ 83	221 $\pm$ 105	269 $\pm$ 85	218 $\pm$ 72	184 $\pm$ 71	189 $\pm$ 112	67 $\pm$ 36 *
BUN (mg $\cdot$ dl $^{-1}$)	1.94 $\pm$ 0.25	2.54 $\pm$ 0.52 *	2.10 $\pm$ 0.25	2.02 $\pm$ 0.34	1.84 $\pm$ 0.17	1.90 $\pm$ 0.19	2.94 $\pm$ 0.96	1.94 $\pm$ 0.36
GLU (mg $\cdot$ dl $^{-1}$)	83 $\pm$ 19	131 $\pm$ 12 **	77 $\pm$ 5	99 $\pm$ 16 *	75 $\pm$ 5	88 $\pm$ 10	89 $\pm$ 39	102 $\pm$ 25
TCHO (mg $\cdot$ dl $^{-1}$)	247 $\pm$ 85	249 $\pm$ 78	306 $\pm$ 84	287 $\pm$ 85	297 $\pm$ 24	241 $\pm$ 59	251 $\pm$ 41	144 $\pm$ 39
TP (g $\cdot$ dl $^{-1}$)	3.82 $\pm$ 0.5	4.12 $\pm$ 0.48	4.36 $\pm$ 0.61	4.24 $\pm$ 0.48	4.18 $\pm$ 0.41	3.92 $\pm$ 0.41	3.76 $\pm$ 0.29	3.24 $\pm$ 0.84
LDH (U $\cdot$ l $^{-1}$)	2007 $\pm$ 356	3258 $\pm$ 1794	3220 $\pm$ 1727	3451 $\pm$ 789	1916 $\pm$ 603	9771 $\pm$ 3917 **	2306 $\pm$ 605	4886 $\pm$ 4176
Ca (mg $\cdot$ dl $^{-1}$)	10.6 $\pm$ 0.8	11.1 $\pm$ 0.5	11.8 $\pm$ 0.9	11.6 $\pm$ 0.7	11.2 $\pm$ 0.3	11.1 $\pm$ 0.4	11.8 $\pm$ 0.6	12.8 $\pm$ 1.3
Lysozyme activity (Unit $\cdot$ min $^{-1}$)	1.25 $\pm$ 0.31	0.80 $\pm$ 0.45 *	1.45 $\pm$ 0.27	0.95 $\pm$ 0.65 **	1.00 $\pm$ 0.25	1.20 $\pm$ 0.37	0.55 $\pm$ 0.62	2.05 $\pm$ 1.16

* Significant difference, P<0.05; ** Significant difference, P<0.01; *** Significant difference, P<0.001

도면7

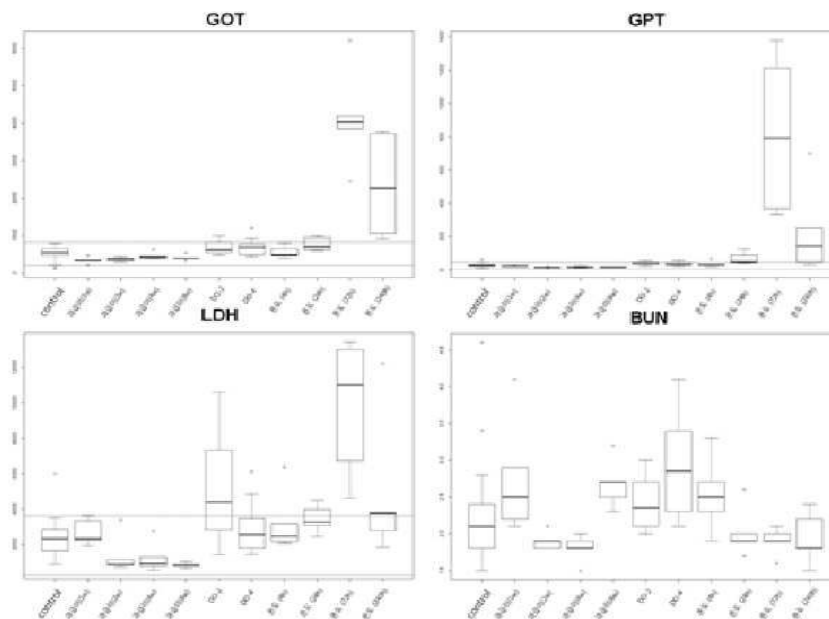


도면8

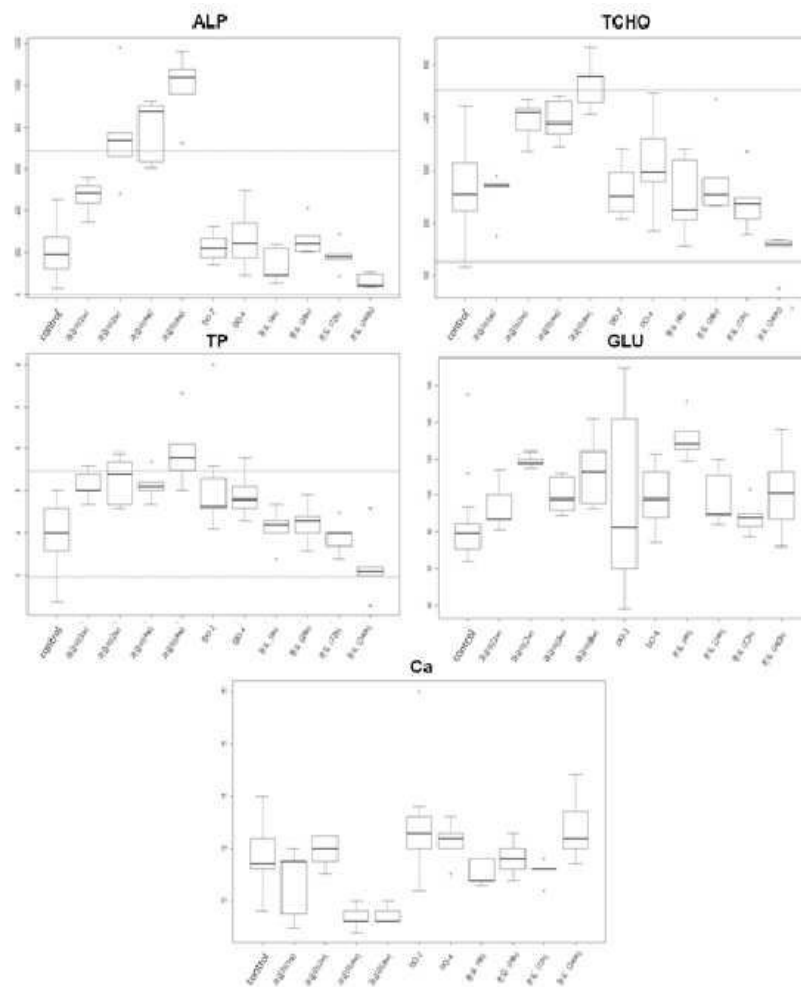
	0 week (con)	1 week	2weeks	4weeks	8weeks
Body weight (g)	89 ± 14 ^a	94 ± 27 ^a	114 ± 16 ^a	153 ± 35 ^b	195 ± 25 ^c
RBC (10 ⁶ cells · ml ⁻¹)	8.1 ± 1.9 ^a	13.6 ± 4.7 ^b	12 ± 4.51 ^{ab}	11.9 ± 4.56 ^{ab}	10.5 ± 1.94 ^{ab}
Hematocrit (%)	34.8 ± 5.4	38.6 ± 2.4	41.4 ± 4.04 ^b	40.2 ± 2.59 ^b	42.6 ± 2.88 ^b
Hemoglobin (g · dl ⁻¹)	5.02 ± 1.07 ^a	5.80 ± 0.91 ^{ab}	7.55 ± 2.37 ^b	6.77 ± 1.49 ^{ab}	6.60 ± 1.64 ^{ab}
MCV (μm)	439 ± 42 ^a	305 ± 79 ^b	376 ± 103 ^{ab}	369 ± 115 ^{ab}	415 ± 71 ^{ab}
MHC (pg)	64 ± 12 ^b	45 ± 10 ^a	64 ± 10 ^{ab}	62 ± 19 ^{ab}	65 ± 23 ^{ab}
MCHC (%)	14 ± 2	15 ± 3	18 ± 5	17 ± 3	15 ± 3
HIS (%)	0.86 ± 0.19 ^a	1.41 ± 0.41 ^b	1.69 ± 0.4 ^b	1.55 ± 0.29 ^b	1.43 ± 0.57 ^b
ESR (%)	98.2 ± 0.84 ^b	93 ± 5.24 ^a	97.80 ± 1.30 ^b	95.6 ± 1.95 ^{ab}	95.6 ± 0.89 ^{ab}
GOT (U · l ⁻¹)	251 ± 130 ^a	336 ± 88 ^{ab}	364 ± 54 ^{ab}	455 ± 104 ^b	406 ± 73 ^b
GPT (U · l ⁻¹)	12 ± 3.4 ^a	22.20 ± 3.5 ^b	13.80 ± 2.2 ^a	15.6 ± 3.7 ^a	15.8 ± 2.1 ^a
ALP (U · l ⁻¹)	153 ± 173 ^a	471 ± 82 ^b	767 ± 257 ^c	787 ± 154 ^c	991 ± 166 ^c
BUN (mg · dl ⁻¹)	1.62 ± 0.11 ^a	2.76 ± 0.81 ^b	1.9 ± 0.12 ^a	1.8 ± 0.19 ^a	2.68 ± 0.33 ^b
GLU (mg · dl ⁻¹)	82.8 ± 7.9 ^a	93.8 ± 13.3 ^{ab}	118.8 ± 3.4 ^d	100.2 ± 10.4 ^{bc}	113.6 ± 20.3 ^{cd}
TCHO (mg · dl ⁻¹)	186.2 ± 80.2 ^a	255.8 ± 46.0 ^b	394.2 ± 38.98 ^b	395.2 ± 40.8 ^b	465.4 ± 50.5 ^b
TP (g · dl ⁻¹)	3.16 ± 0.69 ^a	5.14 ± 0.36 ^b	5.26 ± 0.59 ^b	5.14 ± 0.36 ^b	5.94 ± 0.86 ^b
LDH (U · l ⁻¹)	2181 ± 1075 ^{bc}	2699 ± 736 ^c	1397 ± 1127 ^{ab}	1267 ± 877 ^{ab}	846 ± 139 ^a
Ca (mg · dl ⁻¹)	12.1 ± 0.42 ^c	10.7 ± 1.35 ^b	11.9 ± 0.65 ^c	9.36 ± 0.46 ^a	9.44 ± 0.36 ^a
Lysozyme activity (Unit · min ⁻¹)	1.25 ± 0.53	0.75 ± 0.56	0.55 ± 0.48		

Different letters indicated significant difference, P<0.05

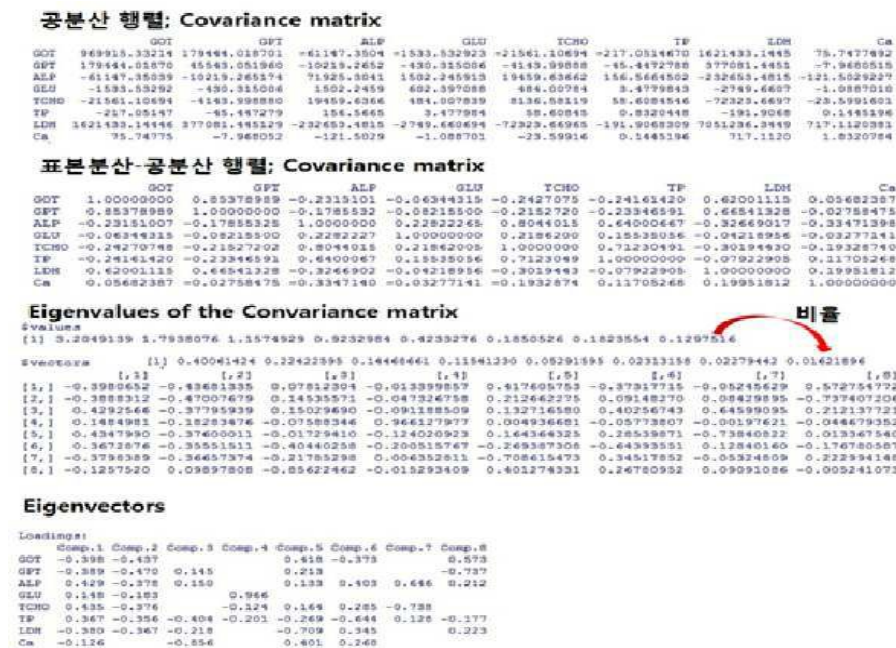
도면9



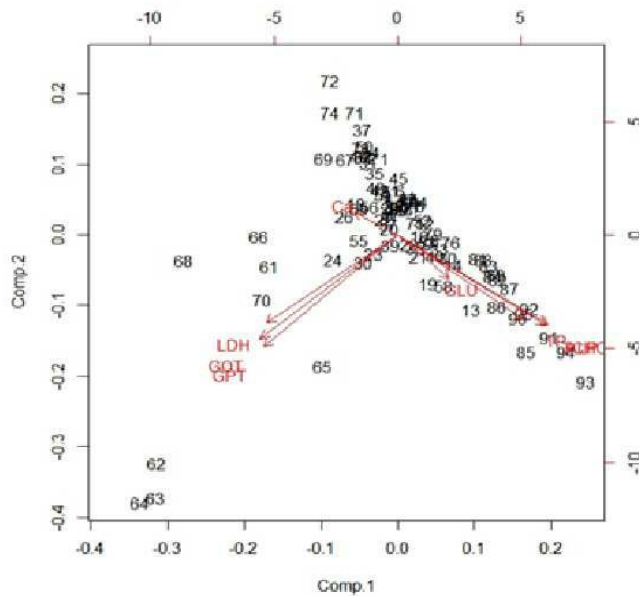
도면10



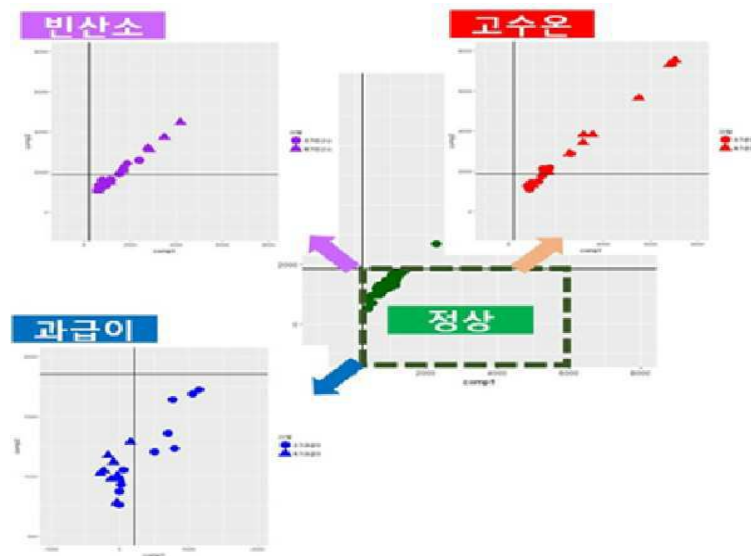
도면12



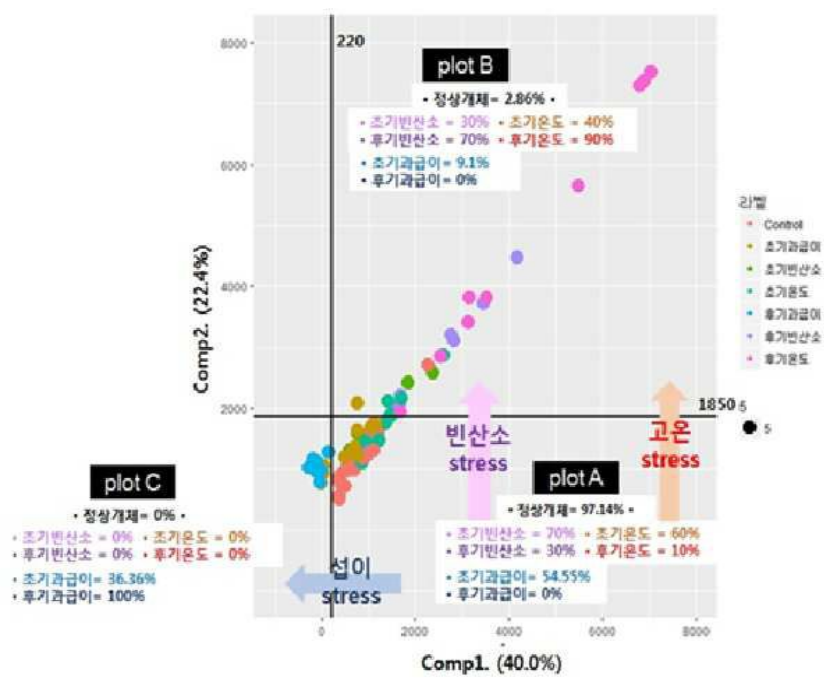
도면13



도면14



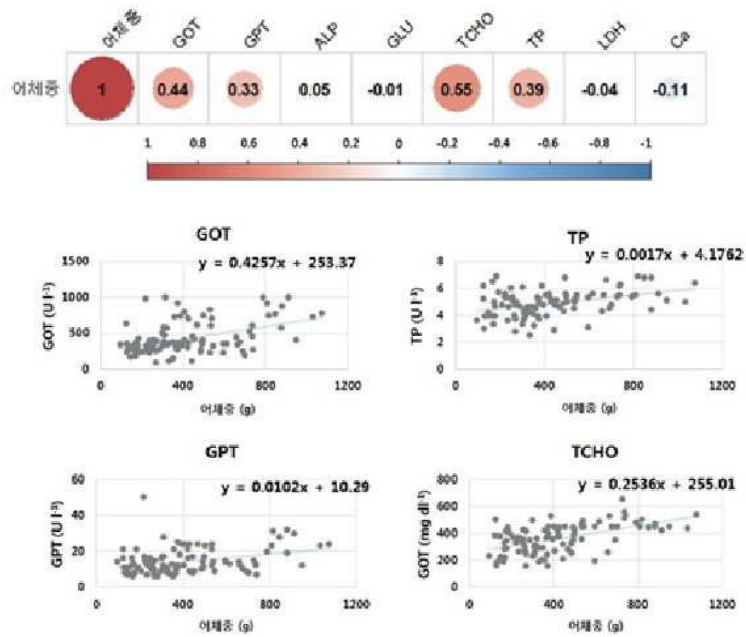
도면15



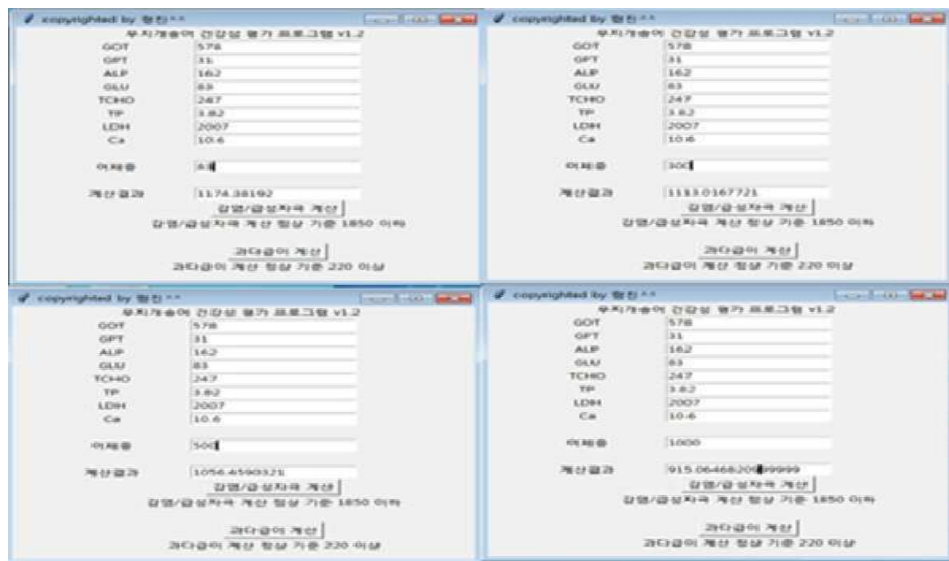
도면16



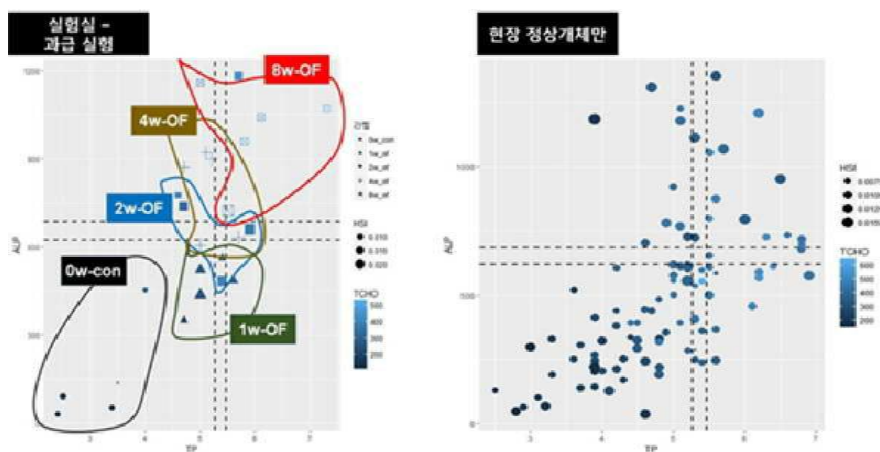
도면17



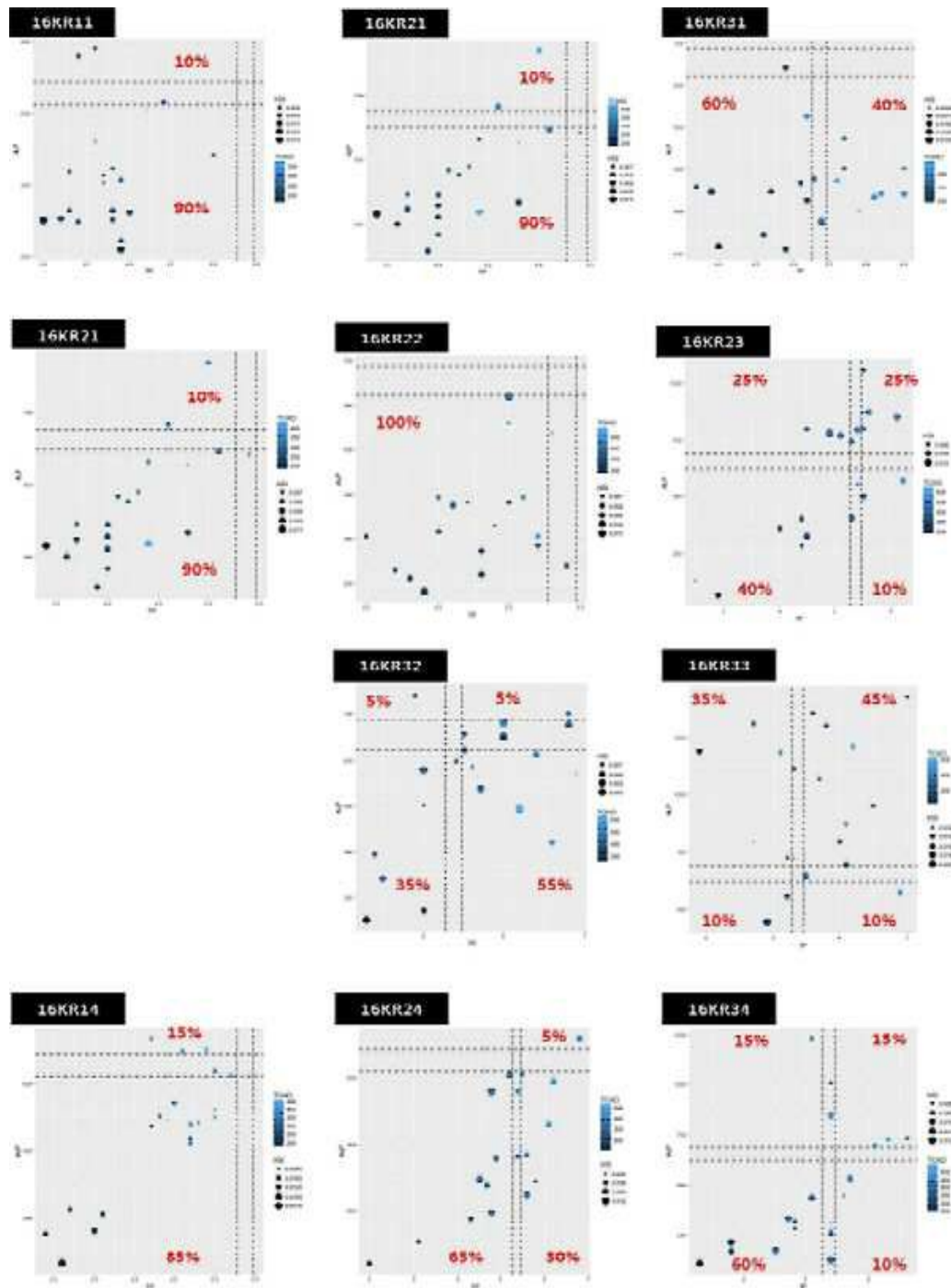
도면18



도면19



도면20



도면21

