

사료 급여 방식에 따른 반추위액 내 휘발성지방산과 단당류 비교 분석과 대사산물 분석

엄준식¹, 이신자¹, 이유경³, 이성실^{1,2*}

¹경상대학교 응용생명과학부(BK21Plus), ²경상대학교 농업생명과학연구원(중점연구소), ³국립축산과학원 영양생리팀

Comparison of Volatile Fatty Acids, Monosaccharide Analysis and Metabolic Profiling in Rumen Fluid According to Feeding Methods

Jun-Sik Eom¹, Shin-Ja Lee², Yoo-Gyung Lee³, Sung-Sill Lee^{1,2*}

¹Division of Applied Life Science(BK21Plus), Gyeongsang National University

²Institute of Agriculture and Life Science & University-Centered Labs, Gyeongsang National University

³Animal Nutrition and Physiology Team, National Institute of Animal Science

요약 거세한우 3두를 3x3 Latin square design 시험방법에 적용하여 사료 적응 기간 10일 후 사료 급여 방식에 따른 반추위액 내 휘발성지방산과 단당류 비교 분석 및 대사산물 분석에 대한 연구를 수행하였다. 연구 결과 HPLC와 HPAEC에서 측정되지 않은 휘발성지방산과 단당류들은 ¹H-NMR에서는 측정이 가능 한 것을 알 수 있었다. ¹H-NMR에서 측정된 대사산물 중, carbohydrate 계열 대사산물 pyruvate는 사료 급여 전 반추위액에서만 측정 되었으며, succinate는 사료 급여 전·후 에서 모두 측정 되었다. Amino acid 계열 대사산물은 총 9가지가 측정 되었다. Lipid 계열 대사산물 ethylene glycol는 사료 급여 전 Con구에서 유의적($P<0.05$)으로 높게 측정 되었다. Aliphatic acyclic compounds 계열 대사산물 trimethylamine N-oxide는 유의적인 차이는 보이지 않았다. 이번 연구를 통해 ¹H-NMR를 이용하여 반추위액 내 많은 대사산물 측정이 가능한 것을 알 수 있었으며 사료 급여 전·후 급여 방식에 따라 대사산물의 변화가 나타나는 것을 확인 할 수 있었다.

Abstract This study was conducted to investigate VFA, monosaccharides and metabolites in rumen fluid according to feeding methods. Three castrated Hanwoo steers were used to the 3x3 Latin square design, 10 day for the diet adaptation period. VFA and monosaccharides which were not detected by HPLC and HPAEC however, those were detected by ¹H-NMR. Among the metabolites measured by ¹H-NMR carbohydrate metabolites, pyruvate was detected only in the rumen fluid before feeding and succinate was detected before and after feeding rumen fluid. In amino acid total 9 metabolites were detected. In lipid metabolites, ethylene glycol was significantly higher ($P<0.05$) in before feeding Con group. In aliphatic acyclic metabolite, trimethylamine N-oxide was no significant difference observed compare to Con group. In this study, many metabolites were observed in the rumen fluid by ¹H-NMR, and it confirmed that rumen metabolic products were changed by feeding methods.

Keywords : Feeding Method, Hanwoo Steers, High Performance Anion-Exchange Chromatography (HPAEC), High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Rumen Fluid, ¹H-Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (¹H-NMR)

본 논문은 농촌진흥청(과제번호 PJ01266401) ‘한우의 메탄 생성량 저감을 위한 반추위 최적 발효조건 구명’에서 지원 받았음.

*Corresponding Author : Sung Sill Lee(Gyeongsang National Univ.)

Tel: +82-55-772-1883 email: lss@gnu.ac.kr

Received October 29, 2018

Revised (1st November 23, 2018, 2nd December 3, 2018)

Accepted December 7, 2018

Published December 31, 2018

1. 서론

반추동물에게 급여하는 사료는 크게 구조탄수화물 함량이 높은 조사료와 전분함량이 높은 농후사료로 분류된다. 조사료는 반추위의 발달과 반추위 내 pH 안정으로 인한 미생물 성장의 촉진 효과 그리고 고능력 착유우의 질병 예방에 효과가 있다[1-3]. 농후사료는 반추동물에게 높은 에너지원으로 쓰일 수 있으므로[4,5] 반추동물의 영양 및 생리적 체계 유지를 위해 적절한 조사료와 농후사료의 급여방식이 필요하다.

반추동물이 이용하는 에너지의 약 70% 이상은 반추위 내 수 많은 미생물이 분비하는 효소들에 의해 단당류에서 단당류 과정을 거쳐 최종적으로 휘발성지방산으로 전환되어 이용하게 된다[6,7]. 반추위 내 생성되는 휘발성지방산은 acetate, propionate 및 butyrate 등이 있고, 생성 비율은 7 : 2 : 1이며, 총 휘발성지방산 농도는 평균 70~130 mM 수준으로 알려져 있다. Acetate는 pyruvate로부터 생성되며, 조사료의 섭취량에 비례하여 농도가 증가하고, 유지방 함량 및 산유량에 연관되어 있으며 [8,9], 생성과정 중 H₂를 발생한다[10]. Propionate는 농후사료 섭취량에 비례하여 농도가 증가하고 체지방 및 유생산량에 연관되어 있으며[11,12], H₂를 이용하여 생성된다[13]. Butyrate는 *Clostridium butyricum* 균의 acetate-lactate 발효과정에서 생성되는 것이 대표적이며 [7], 반추위벽 유두 발달과 연관되어 있으므로 반추동물에게 있어 휘발성지방산은 매우 중요하다[14].

반추위액 내 휘발성 지방산의 분석은 Gas Chromatography; GC[15], High Performance Liquid Chromatography; HPLC[16]등을 이용하고 있고, 단당류 분석은 High Performance Anion-Exchange Chromatography; HPAEC[17]등을 이용하고 있으며, 정확한 정량적 분석이 가능하다는 장점이 있다. 그러나 분석에 필요한 샘플의 전처리, 휘발성지방산 및 단당류에 대한 standard curve 설정과 용매 흘려주기 등 적지 않은 시간과 비용이 든다는 단점이 있다. 최근 국외에서는 NMR (Nuclear Magnetic Resonance)를 이용하여 반추위액 내 휘발성지방산과 단당류 뿐 아니라 대사산물의 분석이 많이 진행되고 있다[18-20]. 비교적 샘플의 전처리 방법이 간단하며 정성 및 정량화가 가능할 뿐 만 아니라 분석시간이 비교적 짧기 때문이다. 국내에서는 식품[21-23], 사람과 돼지의 혈액과 뇨[24-26]등을 이용한

연구는 진행되었지만 반추위액을 이용한 분석은 미비한 실정이다.

그러므로 국내에서 NMR를 이용한 반추위액 분석이 이루어진다면 휘발성지방산과 단당류 뿐 아니라 대사산물 측정이 가능하므로 일석이조의 효과가 있을 것으로 사료된다.

본 연구의 목적은 사료 급여 방식에 따른 사료 급여 전·후 반추위액을 ¹H-NMR를 이용하여 분석하고, HPLC와 HPAEC를 이용하여 대사산물 비교 분석을 실시하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 공시축 및 사양관리

연구 절차 및 공시축의 사양관리는 국립축산과학원 축산생명환경부 실험동물 복지 윤리법에 따라 수행 되었으며 거세 한우 3두(평균체중 533 kg)에게 조사료 0.9 kg(벼짚 0.45 kg + Timothy 0.45 kg)와 농후사료 2.7 kg를 1일 2회 급여하여 시험 시작 전 10일간 사료 적응기간을 설정하였다. 시험에 사용된 사료의 일반성분은 Table 1과 같다[27].

Table 1. The Chemical Composition of Rice Straw, Timothy and Concentrate Used in the Experiment

Chemical composition (% DM)	Rice straw	Timothy	Concentrate
Crude protein	4.80	7.68	18.38
Ether extract	1.52	2.42	3.53
Crude ash	10.31	5.87	6.11
Crude fiber	32.09	34.89	5.74
Ca	0.17	0.20	0.86
P	0.07	0.19	0.55
Acid detergent fiber	46.62	40.55	7.48
Neutral detergent fiber	67.53	64.44	20.76
Cal, (Cal/g)	3769.87	4094.28	3969.76
Dry matter (%)	91.59	91.80	88.71

2.2 시험방법 및 반추위액 채취

시험은 3 x 3 Latin square design 방법으로 수행하였고, 사료는 Con구(농후사료 급여 40분 후 조사료 급여), T1구(조사료 급여 40분 후 농후사료 급여), T2구(조사료와 농후사료 혼합 급여)로 나누어 사료 급여 전, 급여 3

시간 후에 stomach tube를 이용하여 반추위액을 채취하였다. 채취한 반추위액은 50 mL conical tube에 30 mL 옮겨 담아 액체질소로 급속 냉동시킨 후 -80℃에 보관하였다.

2.3 HPLC를 이용한 휘발성지방산 분석

휘발성지방산은 반추위액 1.5 mL를 4℃가 유지되는 원심분리기를 이용하여 12,000 rpm × 3 min 원심분리 후 상등액 1 mL를 0.20 μM syringe filter를 이용하여 여과 하였으며 UV detector (L-2400, Hitachi, Tokyo, Japan)와 column(Metacarb 86H, Varian, Palo Alto, USA)이 장착된 HPLC (L-2200, Hitachi, Tokyo, Japan)를 이용하여 분석하였다[28].

2.4 HPAEC를 이용한 반추위액 내 단당류 분석

단당류는 4℃가 유지되는 원심분리기를 이용하여 3,000 rpm × 15 min 원심분리 후 상등액 3 mL를 0.20 μM syringe filter를 이용하여 여과하였다. 분석은 전류도 검출기가 장착된 HPAEC (ICS-3000, Dionex co., USA)를 사용하여 분석하였으며, CarboPac PA-100 (4 mm x 250 mm, Dionex co., USA)을 컬럼으로 사용하였고, 이동상은 100 mM NaOH 용액을 사용하였다. Flow rate은 1.0 mL/min, 컬럼온도는 25℃로 설정하여 분석을 실시하였다.

2.5 ¹H-NMR를 이용한 대사산물 분석

국외 선행연구의 전처리 방법을 참고하여 ¹H-NMR의 분석을 위한 전처리를 실시하였다[18-20]. 반추위액 1 mL를 4℃가 유지되는 원심분리기를 이용하여 12,000 rpm × 3 min 원심분리 후 상등액 300 μL와 기준물질 TSP용액 300 μL를 혼합하였다. 그 후 혼합된 샘플 600 μL를 5mm NMR tube에 옮겨 담아 SPE-800MHz NMR-MS Spectrometer (Bruker BioSpin AG)를 이용하여 분석을 하였다.

2.5.1 ¹H-NMR 분석 조건

반추위액 샘플에 대한 ¹H-NMR 스펙트럼은 Noesy 1D sequence를 사용하여 결과를 얻었다. 분석은 25℃에서 진행하였고, 물의 피크를 최소화하기 위해 pre-saturation 방법을 사용하였다. 조건은 spectral width 20ppm, acquisition time 2s, time domain 64k로 128번

스캔 하였으며 Saturation delay 1.5초 saturation power 는 6인 saturation frequency에서 분석하였다[25].

2.5.2 데이터 정량값 산출 및 통계분석

각 시료에 대하여 ¹H-NMR 데이터를 얻은 후 Chenomx 8.4 소프트웨어(Chenomx NMR Suite 8.4, Chenomx Inc., Edmonton, Alberta, Canada)를 사용하여 baseline과 phase를 동일하게 맞추었다. 전체 스펙트럼 범위는 0~10 ppm이며 기준 물질로 사용한 TSP는 피크의 위치와 적분값을 일정하게 맞추기 위해 사용하였고, 마지막으로 Chenomx 8.4 소프트웨어와 ¹H-NMR Suite 라이브러리를 이용하여 대사산물에 대한 정량 값을 산출하였다.

시험 결과에 대한 통계분석은 SAS package program (2002)의 general linear model (GLM) procedure를 이용하여 분산분석을 하였고, Duncan's multiple range test[29]의 다중검정방법으로 평균 간의 유의성($P<0.05$)을 검정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 휘발성지방산과 단당류 비교 분석

사료 급여 방식에 따른 반추위액 내 휘발성지방산과 단당류 비교 분석 결과는 Table 2와 3과 같다.

사료 급여 전 반추위액 내 total VFA 및 Acetate / Propionate ratio를 제외한 6가지 휘발성지방산 중, HPLC에서는 acetate, propionate, butyrate 및 isovalerate가 측정되었고, 그 중 propionate함량은 Con구에서 유의적($P<0.05$)으로 높게 측정 되었으며 Acetate / Propionate ratio는 Con구에서 유의적($P<0.05$)으로 낮은 결과를 보였다. ¹H-NMR에서는 acetate, propionate, butyrate 및 isobutyrate가 측정 되었으며, 그 중 total VFA 및 acetate 함량은 Con구에서 유의적($P<0.05$)으로 높게 측정되었다.

사료 급여 3시간 후 반추위액 내 휘발성지방산 중 HPLC에서는 사료 급여 전 반추위액에서 측정된 목록과 일치 하였으며 total VFA, acetate, propionate 및 butyrate 함량은 Con구에서 유의적($P<0.05$)으로 높게 측정되었다. 휘발성지방산은 사료 급여 방식에 따라 변화하며, 농후사료는 조사료에 비해 분해속도가 빠르므로

Table 2. Concentration of Volatile Fatty Acids in Rumen Fluid by High Performance Liquid Chromatography and ¹H-Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy

Compounds(mM/L)	Analysis instrument						P-value	
	HPLC			¹ H-NMR			HPLC	NMR
	Con ¹⁾	T1 ²⁾	T2 ³⁾	Con	T1	T2		
<i>Before feeding fermentation</i>								
Total VFA	52.14	48.05	41.74	50.81 ^a	43.30 ^b	42.93 ^b	0.4871	0.0175
Acetate	31.71	28.67	26.19	34.29 ^a	28.21 ^b	29.35 ^b	0.4558	0.019
Propionate	12.22 ^a	8.08 ^b	8.62 ^{ab}	8.46	7.64	6.56	0.0696	0.1425
Butyrate	7.48	10.61	6.26	7.21	7.02	6.32	0.3803	0.2432
Isobutyrate		ND ⁴⁾		0.84	0.65	0.70	-	0.828
Isovalerate	1.39	1.35	1.32		ND		0.955	-
Acetate / Propionate ratio	2.64 ^b	3.55 ^a	3.03 ^{ab}	4.12	3.73	4.50	0.0331	0.3036
<i>After 3h feeding fermentation</i>								
Total VFA	89.89 ^a	52.22 ^b	57.36 ^b	57.76	52.96	47.24	0.0082	0.7179
Acetate	54.42 ^a	31.88 ^b	34.88 ^b	35.62	32.51	29.03	0.0036	0.6856
Propionate	21.91 ^a	11.70 ^b	13.94 ^b	11.29	9.88	8.20	0.0243	0.6705
Butyrate	12.29 ^a	8.00 ^b	7.90 ^b	8.22	8.23	7.04	0.0399	0.6698
Isobutyrate		ND		0.71	0.91	0.85	-	0.4969
Valerate		ND		1.60	1.48	1.37	-	0.8878
Isovalerate	1.94 ^a	1.29 ^b	1.30 ^b	0.49 ^{ab}	0.39 ^b	0.75 ^a	0.0212	0.0469
Acetate / Propionate ratio	2.54	2.74	2.51	3.26	3.49	3.57	0.5463	0.7005

¹⁾ : Fed concentration first and 40 minutes later fed roughage ²⁾ : Fed roughage first and 40 minutes later fed concentration

³⁾ : Fed roughage and concentration mixed ⁴⁾ : Not Detected(ND)

^{ab}Means with different superscripts in the same row differ significantly ($P<0.05$)

Table 3. Concentration of Monosaccharide in Rumen Fluid by High Performance Anion-Exchange Chromatography and ¹H-Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy

Compounds(mM/L)	Analysis instrument						P-value	
	HPAEC(mg/L)			¹ H-NMR(mM/L)			HPAEC	NMR
	Con ¹⁾	T1 ²⁾	T2 ³⁾	Con	T1	T2		
<i>Before feeding fermentation</i>								
Glucose	425.13	221.97	305.67	3.206	2.823	2.327	0.2248	0.6527
Fructose	29.63 ^a	16.07 ^b	18.93 ^{ab}	0.127	0.247	0.265	0.0563	0.1022
Mannose	3.63 ^a	1.57 ^b	2.13 ^b				0.0195	
Arabinose	2.87	1.87	2.47				0.6249	
Galactose	2.40	1.87	2.23		ND ⁴⁾		0.6813	-
Xylose	2.30	1.27	1.93				0.3225	
<i>After 3h feeding fermentation</i>								
Glucose	516.03	412.93	358.90	2.541	2.435	1.581	0.6287	0.7975
Fructose	20.43	16.43	10.70	0.313 ^a	0.083 ^b	0.142 ^b	0.1167	0.0418
Mannose	6.70	3.05	2.93	0.375	0.100	0.011	0.1643	0.5214
Arabinose	6.80	3.23	3.13				0.3358	
Galactose	7.33	2.97	3.47		ND		0.4274	-
Xylose	7.37	3.40	4.50				0.3973	

¹⁾ : Fed concentration first and 40 minutes later fed roughage ²⁾ : Fed roughage first and 40 minutes later fed concentration

³⁾ : Fed roughage and concentration mixed ⁴⁾ : Not Detected(ND)

^{ab}Means with different superscripts in the same row differ significantly ($P<0.05$)

이와 같은 결과가 나타났다고 사료된다. Isobutyrate 및 isovalerate는 branched chain fatty acid (BCFA)로 불리며 반추위 내 섬유소 분해 미생물 성장과 연관이 있으므로[30] 미량이지만 반추동물에게 있어 중요한 휘발성지방산이다. 연구결과, Con구에서 isovalerate 함량이 유의적($P<0.05$)으로 높게 측정 되었으며 나머지 급여 방식에서도 적정수치의 결과를 보였다.

사료 급여 전 반추위액 내 단당류 중, HPAEC에서는 6가지가 측정 되었다. Fructose 및 mannose 함량은 Con구에서 유의적($P<0.05$)으로 높게 측정 되었으며 나머지 단당류들은 유의적인 차이를 보이지 않았다. 사료 급여 후 반추위액 내에서도 역시 6가지 단당류가 측정 되었으나, 유의적인 차이를 보이지 않았다.

$^1\text{H-NMR}$ 에서 측정된 단당류는 fructose, glucose, 및 mannose이고 glucose가 가장 높게 측정되었다. Woods 등에 의하면 fructose는 사람과 쥐의 간에서 Pi의 일시적 감소로 인해 ATP 함량이 감소되었다고 하였고[31], Yair과 Allen에 의하면 fructose는 acetate의 전구물질로

서, 착유우에 있어 ATP 함량 감소시켜 포만감 지연감소로 인한 사료 섭취량이 증가 한다고 하였다[32]. 또한 Kumar 등에 의하면 fructose가 분해되면 최종적으로 acetate를 생성하게 되는데 그 과정 중 발생하는 H_2 를 methanogen이 이용하여 메탄 생성을 한다고 알려져 있다[33]. 연구결과, 사료 급여 3시간 후 Con구에서 fructose 함량이 유의적($P<0.05$)으로 높게 측정되었고, acetate 함량 또한 Con구에서 유의적($P<0.05$)으로 높게 측정된 것으로 보아 농후사료 급여 후 조사료를 급여 하게 되면 메탄 발생량이 높아 질 것으로 사료된다.

3.2 $^1\text{H-NMR}$ 를 이용한 반추위액 내 대사산물

사료 급여 방식에 따른 반추위액 내 대사산물은 기준 물질 TSP를 포함하여 총 55개를 정량하였으며, 휘발성 지방산 계열 6종, carbohydrate 계열 13종, amino acid 9종, lipid 계열 5종 그리고 기타계열 22종으로 대사산물을 분류 하였다. 반추위액의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼 피크의 양상은 비슷하였으나, 1,3-Dihydroxyacetone, isocitrate,

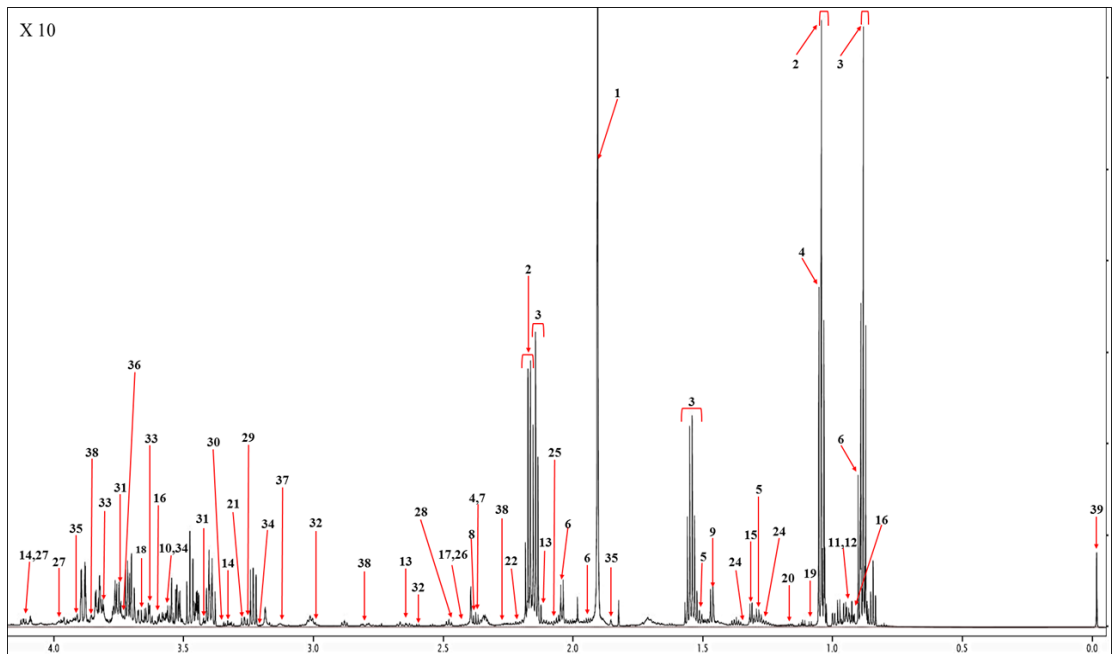


Fig. 1. The Representative Spectrum $^1\text{H-NMR}$ Obtained from Rumen Fluid Samples. The Spectra were Constructed Using TSP at 0.00 ppm as Reference

Spectra number - 1: Acetate, 2: Propionate, 3: Butyrate, 4: Isobutyrate, 5: Valerate, 6: Isovalerate, 7: Pyruvate, 8: Succinate, 9: Alanine, 10: Glycine, 11: Isoleucine, 12: Leucine, 13: Methionine, 14: Proline, 15: Threonine, 16: Valine, 17: 3-Hydroxy-3-methylglutarate, 18: Ethylene glycol, 19: Methylsuccinate, 20: Isopropanol, 21: Trimethylamine N-oxide, 22: p-Cresol, 23: 2-Hydroxyisobutyrate, 24: 3-Hydroxyisovalerate, 25: N-Acetylcysteine, 26: Pantothenate, 27: Gluconate, 28: 4-Pyridoxate, 29: Betaine, 30: Caffeine, 31: Fructose, 32: Isocitrate, 33: Xylitol, 34: O-Phosphocholine, 35: Glycylproline, 36: Guanidoacetate, 37: Malonate, 38: Succinylacetone, 39: TSP.

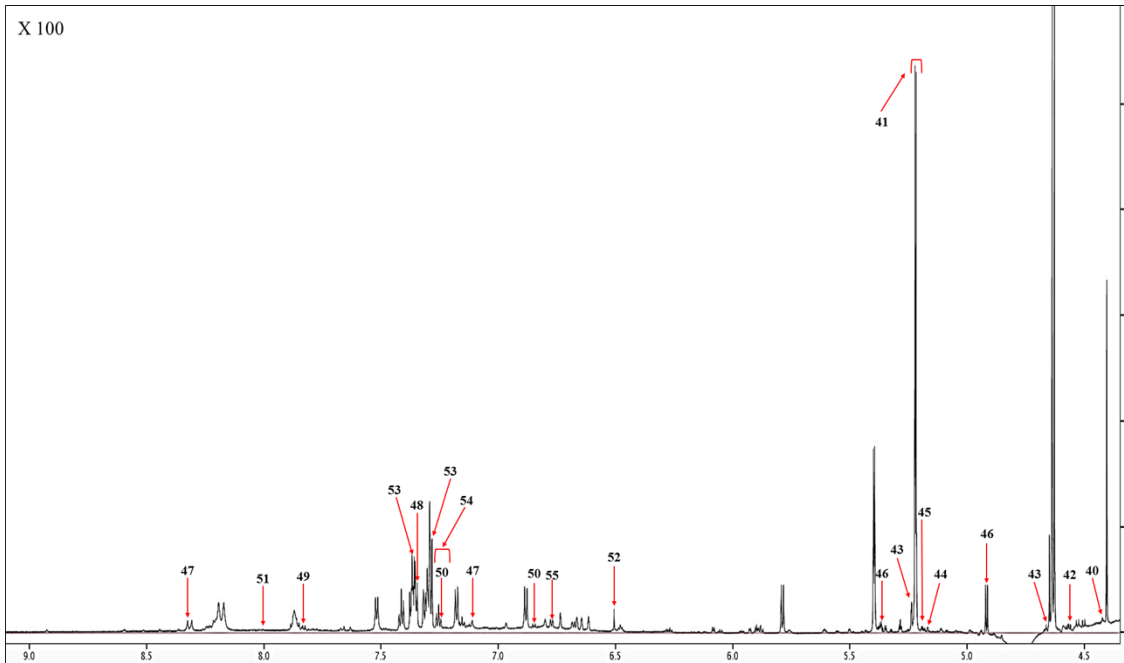


Fig. 2. Continued

Spectra number - 40: 1,3-Dihydroxyacetone, 41: Glucose, 42: Lactulose, 43: Maltose, 44: Mannose, 45: N-Acetylglucosamine, 46: Ribose, 47: Anserine, 48: 3,5-Dibromotyrosine, 49: Histamine, 50: 3-Hydroxyphenylacetate, 51: N-Acetylmethionine, 52: Fumarate, 53: Phenylacetate, 54: 3-Phenylpropionate, 55: Thymol.

pyruvate, ethylene glycol, methyl succinate, proline, N-acetylmethionine, fumarate 및 gluconate는 사료 급여 전 반추위액에서만 정량되었고, valerate, isovalerate, mannose, xylitol, thymol, isopropanol, O-phosphocholine, guanidoacetate, malonate 및 succinylacetone는 사료 급여 3시간 후 반추위액에서만 정량된 대사산물을 확인할 수 있었다. Fig 1과 2는 ¹H-NMR을 이용한 반추위액의 스펙트럼 결과이며, 대사산물은 one peak, double peak 그리고 multi peak 형태로 측정 되었다.

3.3 ¹H-NMR을 이용한 사료 급여 방식에 따른 반추위액 내 대사산물 확인 및 변화

사료 급여 방식에 따른 반추위액 내 측정된 대사산물에 대한 결과는 Table 4와 같다.

Carbohydrate 대사산물 1,3-Dihydroxyacetone는 acetone의 전구물질로서 반추동물에게 급여하는 곡류사료의 비율이 높아지면 농도가 감소한다고 알려져 있다 [20]. 연구결과, 사료 급여 전에서는 유의적인 차이를 보이지 않았으며 사료 급여 3시간 후 반추위액에서는 측정되지 않았다. N-Acetylglucosamine은 단당류와 이당류

들과 함께 *Kandleria* 유전체의 enzyme II에 의해 수송된다고 알려져 있고[33], chitin의 주요 구성요소로서 골격근과 섬유소와 연관되어 있다고 알려져 있다[34]. 연구 결과, 사료 급여 3시간 후 T2구에서 Con구에 비해 유의적($P<0.05$)으로 낮게 측정되었다. Pyruvate 및 succinate는 반추동물에 포함된 모든 생명체에 매우 중요한 중간대사산물로 알려져 있다. 연구결과, pyruvate는 사료 급여 전에서만 측정되었고 유의적인 차이는 보이지 않았으며, succinate는 사료 급여 전·후 모두 측정되었으나 유의적인 차이는 보이지 않았다.

반추위 내 amino acids는 pyruvate, asparagine 및 glutamate등의 중간대사산물이 미생물에 의해 합성된다고 알려져 있다. 반추위 내 합성 후 생성되는 모든 아미노산은 측정되지 않았지만 이번 연구에서 측정된 아미노산 중 pyruvate 유래 아미노산 alanine, isoleucine, leucine 및 valine, asparagine 유래 아미노산 methionine 및 threonine이 측정되었으며 마지막으로 glutamate 유래 아미노산 proline이 측정되었다. 사료 급여 전·후 및 급여 방식에 따른 유의적인 차이는 보이지 않았으며 proline은 사료 급여 전에서만 측정되는 특이점을 발견하였다.

Table 4. List of Metabolites in Rumen Fluid According to Different Feeding Methods and Fermentation Time

Metabolites(mM/L)	Fermentation time						P-value	
	BF ¹⁾			AF ²⁾			BF	AF
	Con ³⁾	T1 ⁴⁾	T2 ⁵⁾	Con	T1	T2		
<i>Carbohydrates</i>								
1,3-Dihydroxyacetone	0.078	0.066	0.059		ND ⁶⁾		0.0666	-
Isocitrate	0.197	0.168	0.300		ND		0.4211	-
Lactulose	0.126	0.101	0.105	0.125	0.070	0.082	0.9148	0.5448
Maltose	0.209	0.398	0.149	0.425	0.215	0.626	0.2156	0.5868
N-Acetylglucosamine	0.145	0.126	0.202	0.183 ^a	0.173 ^a	0.045 ^b	0.4123	0.0263
Pyruvate	0.095	0.048	0.079		ND		0.2309	-
Ribose	0.539	0.594	0.561	0.424	0.367	0.339	0.8303	0.7080
Succinate	0.040	0.038	0.028	0.022	0.010	0.030	0.3324	0.6889
Xylitol		ND		0.091	0.103	0.301	-	0.1175
<i>Amino acids</i>								
Alanine	0.400	0.225	0.322	0.315	0.464	0.292	0.3604	0.4340
Anserine	0.090	0.099	0.077	0.062	0.067	0.071	0.7226	0.9449
Glycine	0.141	0.094	0.068	0.076	0.058	0.088	0.1715	0.6192
Isoleucine	0.167	0.152	0.144	0.123	0.107	0.100	0.9255	0.6850
Leucine	0.260	0.182	0.154	0.144	0.088	0.087	0.3887	0.5635
Methionine	0.081	0.082	0.093	0.059	0.055	0.061	0.8352	0.9340
Proline	0.345	0.359	0.369		ND		0.9786	-
Threonine	0.238	0.225	0.224	0.170	0.197	0.166	0.9857	0.8769
Valine	0.128	0.193	0.174	0.164	0.149	0.154	0.4977	0.9240
<i>Lipids</i>								
3,5-Dibromotyrosine	0.042	0.027	0.030	0.034	0.034	0.020	0.6747	0.6260
3-Hydroxy-3-methyl glutarate	0.045	0.031	0.046	0.047	0.016	0.061	0.8358	0.2391
Ethylene glycol	0.056 ^a	0.020 ^b	0.016 ^b		ND		0.0541	-
Methylsuccinate	0.046	0.033	0.033		ND		0.8731	-
Thymol		ND		0.020	0.021	0.019	-	0.9326
<i>Alcohols</i>								
Isopropanol		ND		0.014	0.012	0.010	-	0.3947
<i>Aliphatic acyclic compounds</i>								
O-Phosphocholine		ND		0.021 ^b	0.152 ^a	0.065 ^b	-	0.0492
Trimethylamine N-oxide	0.014 ^{ab}	0.023 ^a	0.006 ^b	0.033	0.036	0.039	0.0676	0.9882
<i>Amines</i>								
Histamine	0.015	0.023	0.020	0.020	0.040	0.008	0.7577	0.1693
<i>Benzoic acids</i>								
p-Cresol	0.024	0.018	0.016	0.014 ^b	0.026 ^a	0.012 ^b	0.7720	0.0756
<i>Carboxylic acids</i>								
2-Hydroxyisobutyrate	0.012	0.011	0.011	0.011	0.015	0.011	0.8785	0.6664
3-Hydroxyisovalerate	0.035	0.032	0.039	0.027	0.024	0.030	0.8871	0.9138
3-Hydroxyphenylacetate	0.030	0.037	0.043	0.023	0.031	0.026	0.4970	0.6851
Glycyl proline	0.046	0.103	0.105	0.100	0.030	0.079	0.2807	0.2690
Guanidoacetate		ND		0.023 ^{ab}	0.044 ^a	0.016 ^b	0.0751	-
Malonate		ND		0.019	0.045	0.032	0.2967	-
N-Acetylcysteine	0.047	0.051	0.059	0.048	0.065	0.024	0.7532	0.3757
N-Acetylmethionine	0.050	0.073	0.069		ND		0.6621	-
Pantothenate	0.021	0.051	0.039	0.034	0.028	0.024	0.2854	0.1729
<i>Organic acids</i>								
Fumarate	0.014	0.009	0.018		ND		0.4264	-
Gluconate	0.114	0.090	0.107		ND		0.8365	-
Phenylacetate	0.307	0.299	0.263	0.364	0.371	0.318	0.5923	0.8121
Succinylacetone		ND		0.014	0.025	0.010	-	0.4283
<i>Others</i>								
3-Phenylpropionate	0.218	0.196	0.217	0.180	0.275	0.242	0.3485	0.5440
4-Pyridoxate	0.010	0.010	0.016	0.014	0.017	0.014	0.1275	0.9272
Betaine	0.010	0.005	0.007	0.003	0.013	0.004	0.6452	0.3428
Caffeine	0.005	0.003	0.015	0.025	0.011	0.025	0.2019	0.3340

¹⁾ : Before Feeding(BF) ²⁾ : Feeding of 3 hours later(AF) ³⁾ : Fed concentration first and 40 minutes later fed roughage
⁴⁾: Fed roughage first and 40 minutes later fed concentration ⁵⁾ : Fed roughage and concentration mixed ⁶⁾ : Not Detected(ND)
^{ab}Means with different superscripts in the same row differ significantly ($P<0.05$)

Lipid 계열 대사산물 ethylene glycol는 사료 급여 전 Con구에서 유의적($P<0.05$)으로 높게 측정 되었으나, methyl succinate는 유의적인 차이는 보이지 않았다. $^1\text{H-NMR}$ 기기를 이용한 반추위액 내 포화지방산, 불포화지방산 등의 대사산물은 측정 되지 않았는데 그 이유는 다른 대사산물들에 비해 고분자로 이루어져 있으므로 이러한 결과가 나타났다고 사료된다.

Aliphatic acylic compounds 계열 대사산물 trimethylamine N-oxide는 반추위 내 미생물이 trimethylamine을 이용하여 간에서 합성 후 생성되며, methanogen이 이용하는 trimethylamine과 밀접한 상관관계가 있다고 알려져 있다[35]. 연구결과, 사료 급여 전 T1구에서 가장 높게 측정 되었지만 Con구와 비교 하였을 때 유의적인 차이는 보이지 않았으며, 사료 급여 3시간 후 모든 급여 방식에서 비슷한 농도를 나타내었다.

반추위 내 amine 계열 대사산물의 농도가 높으면 pH가 감소되고 산중독증을 유발시킨다고 알려져 있다. 그중 histamine의 농도가 0~0.3 $\mu\text{g/mL}$ 이면 건강한 반추동물이며, 반추위 내 pH가 4.5이하이며 농도가 3.0~70.0 $\mu\text{g/mL}$ 이면 산중독증에 걸린 반추동물로 분류 할 수 있다[36,37]. 연구결과, 사료 급여 전·후 및 급여 방식에 따른 유의적인 차이는 보이지 않았으며 산중독증 농도 범위를 넘지 않는 것을 확인 할 수 있었다.

Benzoic acid 계열 대사산물 p-cresol은 반추위 내 tryptophan과 tyrosine을 탈아민과 탈카르복실화반응을 통해 생성된다고 알려져 있으며 β -carotene 분해작용과 연관이 되어 있다[38,39]. 또한 O'Callaghan 등에 의하면 white clover를 섭취한 젖소는 TMR (Total Mixed Rations)를 섭취한 젖소보다 높은 수치를 보였다는 연구결과가 있었다[40]. 연구결과, 사료 급여 전에서는 유의적인 차이를 보이지 않았으며, 사료 급여 3시간 후 T1구에서 Con구에 비해 유의적($P<0.05$)으로 높게 측정 되었다.

Carboxylic acids 계열 대사산물 2-Hydroxyisobutyrate, 3-Hydroxyisovalerate 및 3-Hydroxyphenylacetate와 others 계열 대사산물 3-Phenylpropionate은 휘발성지방산의 중간대사산물로 사료되며 연구결과, 사료 급여 전·후 및 급여 방식에 따른 유의적인 차이는 보이지 않았다.

4. 결론

사료 급여 방식에 따른 사료 급여 전·후 반추위액을

$^1\text{H-NMR}$ 를 이용하여 분석하고, HPLC와 HPAEC를 이용하여 대사산물 비교 분석을 실시하였다.

연구결과, $^1\text{H-NMR}$ 과 HPLC에서 측정된 휘발성지방산 종류는 차이가 있었고, $^1\text{H-NMR}$ 에서 valerate 및 isovalerate가 추가로 측정 되었다. HPAEC에서 측정된 단당류는 $^1\text{H-NMR}$ 에서는 거의 측정 되지 않았지만, 단당류의 전구대사산물과 다른 종의 단당류가 측정 되었다. $^1\text{H-NMR}$ 에서 측정된 대사산물의 정량화가 더욱 정밀하게 이루어진다면 반추위액 내 휘발성지방산과 단당류 분석에 쓰이는 HPLC와 HPAEC의 대처가 가능 할 것으로 사료된다.

$^1\text{H-NMR}$ 에서 정량화 된 대사산물은 55개였으며, 사료 급여 방식에 따른 반추위액 내 대사산물은 많은 변화가 있었다. 또한 국외 선행연구의 반추위액 내 정량화된 대사산물과 대부분 일치하는 것을 확인 할 수 있었다.

추후 국내에서 지속적인 연구가 수행된다면 더 많은 대사산물을 정량화 할 수 있을 것이며, 더 나아가 반추위 내 대사산물의 역할 구명에 대한 연구가 필요 할 것으로 사료된다.

References

- [1] G. L. Jin, J. K. Kim, W. Z. Qin, J. Jeong, S. S. Jang, C. W. Choi, M. K. Song, "Effects of feeding whole crop barley silage- or whole crop rye silage based-TMR and duration of TMR feeding on growth, feed cost and meat characteristics of hanwoo steers", *Journal of Animal Science and Technology*, Vol. 54, No. 2, pp. 111-124, 2012.
DOI : <http://doi.org/10.5187/JAST.2012.54.2.111>
- [2] R. Schmitz, K. Schnabel, D. Von Soosten, U. Meyer, L. Huther, H. Spiekers, J. Rehage, S. Danicke, "Changes of ruminal pH, rumination activity and feeding behaviour during early lactation as affects by different energy and fibre concentration of roughage in pluriparous dairy cows", *Archives of Animal Nutrition*, Vol. 72, No. 6, pp. 458-477, 2018.
DOI : <http://doi.org/10.1080/1745039X.2018.1526535>
- [3] F. G. Jiang, X. Y. Lin, Z. G. Yan, Z. Y. Hu, G. M. Liu, Y. D. Sun, X. W. Liu, Z. H. Wang, "Effect of dietary roughage level on chewing activity, ruminal pH, and saliva secretion in lactating Holstein cows", *Journal of Dairy Science*, Vol. 100, No. 4, pp. 2660-2671, 2017.
DOI : <http://doi.org/10.3168/jds.2016-11559>
- [4] I. K. Han, W. J. Maeng, K. K. Park, I. K. Baek, S. J. Oh, Y. J. Choi, "Sunjin Publishing Company", Seoul, Republic of Korea, 1993.
- [5] J. C. McCann, S. Luan, F. C. Cardoso, H. Derakhshani, E. Khafipour, J. K. Loor, "Induction of subsacute

- ruminal acidosis affects the ruminal microbiome and epithelium”, *Frontiers in Microbiology*, Vol. 7, pp. 1-18, 2016.
DOI : <http://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00701>
- [6] D. P. Casper, D. J. Schingoethe, W. A. Eisenbeisz, “Response of early lactation dairy cows fed diets varying in sources of nonstructural carbohydrate and crude protein”, *Journal of Dairy Science*, Vol. 73, No. 4, pp. 1039-1050, 1990.
DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(90\)78763-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78763-2)
- [7] J. K. Ha, S. S. Lee, Y. S. Moon, C. H. Kim, S. W. Seo, M. K. Beak, S. S. Lee, S. Y. Lee, W. S. Lee, J. S. Jang, N. J. Choi, “Ruminant nutrition and physiology”, Seoul National University press, pp. 203-207, 2013.
- [8] N. L. Urrutia, K. J. Harvatine, “Acetate dose-dependently stimulates milk fat synthesis in lactating Dairy cows”, *The Journal of Nutrition*, Vol. 147, No. 5, pp. 763-769, 2017.
DOI: <https://doi.org/10.3945/jn.116.245001>
- [9] D. R. Grant, P. R. Patel, “Changes of protein composition of milk by ratio of roughage to concentrate”, *Journal of Dairy Science*, Vol. 63, No. 5, pp. 756-761, 1980.
DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(80\)83004-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(80)83004-9)
- [10] J. P. Jouany, D. P. Morgavi, “Use of ‘natural’ products as alternatives to antibiotic feed additive in ruminant production”, *Animal*, Vol. 1, No. 10, pp. 1443-1446, 2007.
DOI: <https://doi.org/10.1017/S1751731107000742>
- [11] D. C. Church. “The ruminant animal; Digestive physiology and nutrition”, Waveland press, 1998.
- [12] M. J. Ko, D. S. Kim, S. Y. Jeong, B. Kim, O. D. Kang, S. C. Lee, W. S. Lee, “The effects of sodium bicarbonate and liquid buffer on milk yield, milk composition and blood metabolites of Holstein dairy cows”, *Journal of Agriculture & Life Science*, Vol. 48, No. 6, pp. 243-251, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.14397/jals.2014.48.6.243>
- [13] M. A. Grobner, D. E. Johnson, S. R. Goodall, D. A. Benz, “Sarsaponin effects on in vitro continuous flow fermentation of a high grain diet”, *Journal of Animal Science*, Vol. 33, pp. 64-66, 1982.
- [14] E. G. Sander, H. N. Warner, H. N. Harrison, J. K. Loosli, “The stimulatory effects of sodium butyrate and sodium propionate on the development of rumen mucosa in the young calf”, *Journal of Dairy Science*, Vol. 42, No. 9, pp. 1600-1605, 1959.
DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(59\)90772-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(59)90772-6)
- [15] E. Erwin, G. Marco, E. Emery. “Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography”, *Journal of Dairy Science*, Vol. 44, pp. 1768-1771, 1961.
DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(61\)89956-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(61)89956-6)
- [16] A. T. Adesogan, N. K. Krueger, M. B. Salawu, D. B. Dean, C. R. Staples, “The influence of treatment with dual-purpose bacterial inoculants or soluble carbohydrates on the fermentation and aerobic stability of bemudagrass”, *Journal of Dairy Science*, Vol. 87, No. 10, pp. 3407-3416, 2004.
DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73476-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73476-1)
- [17] D. R. Jones, M. S. Uddin, R. J. Gruninger, T. T. M. Pham, D. Thomas, A. B. Boraston, J. Briggs, B. Pluvinage, T. A. McAllister, R. J. Forster, A. Tsang, L. B. Selinger, D. W. Abbott, “Discovery and characterization of family 39 glycoside hydrolases from rumen anaerobic fungi with polyspecific activity on rare arabinosyl-substrates”, *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 292, No. 30, pp. 12606-12620, 2017.
DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.789008>
- [18] R. Zhang, W. Zhu, L. Jiang, S. Mao, “Comparative metabolome analysis of ruminal changes in Holstein dairy cows fed low- or high- concentrate diets”, *Metabolomics*, Vol. 13, pp. 74, 2017.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s11306-017-1204-0>
- [19] F. Saleem, S. Bouatra, C. Guo A., N. Psychogios, R. Mandal, S. M. Dunn, B. N. Ametaj, Wishart, D. S., “The Bovine Ruminal Fluid Meabolome”, *Metabolomics*, Vol. 9, No. 2, pp. 360-378, 2013.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s11306-012-0458-9>
- [20] F. Saleem, B. N. Ametaj, S. Bouatra, R. Mandal, Q. Zebeli, S. M. Dunn, D. S. Wishart, “A metabolomics approach to uncover the effects of grain diets on rumen health in dairy cows”, *Journal of Dairy Science*, Vol. 95, No. 11, pp. 6606-6623, 2012.
DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5403>
- [21] J. Lee, M. Choi, J. Kang, Y. Chung, Y. I. Jin, M. Kim, Y. Lee, Y. H. Chang, “Physicochemical, structural, pasting, and rheological properties of potato starch isolated from different cultivars”, *Food Science and Technology*, Vol. 49, No. 4, pp. 360-368, 2017.
DOI: <http://doi.org/10.9721/KJFST.2017.49.4.360>
- [22] Y. J. Ha, S. K. Kim, S. E. Yoo, S. K. Yoo, “Separation and purification of antioxidant activity acidic polysaccharide from Red Ginseng Marc”, *Journal of Oil & Applied Science*, Vol. 34, No. 4, pp. 915-923, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.12925/jkocs.2017.34.4.915>
- [23] S. Y. Park, Y. J. Jeong, M. Y. Kim, J. H. Hwang, T. K. Kwon, Y. H. Seo, “An analytical method for the validation of a salt-enhancing peptide using a liquid chromatography and a nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy”, *Journal of Life Science*, Vol. 27, No. 11, pp. 1324-1330, 2017.
DOI: <http://doi.org/10.5352/JLS.2017.27.11.1324>
- [24] J. Y. Cho, “Multivariate analysis on 1H-NMR Spectroscopy of olive flounder paralichthys olivaceus serum”, *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, Vol. 45, No. 4, pp. 367-371, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2012.0367>
- [25] J. Y. Jeong, G. S. Hwang, J. C. Park, D. H. Kim, M. Ha, “¹H NMR-Based urinary metabolic profiling of gender and diurnal variation in healthy Korean subjects”, *Environmental health & toxicology*, Vol. 25, No. 4, pp. 295-306, 2010.
- [26] J. Y. Jeong, M. S. Kim, H. J. Jung, M. J. Kim, H. J. Lee, S. D. Lee, “Screening of the liver, serum, and urine of piglets fed zearalenone using a NMR-based metabolomic approach.”, *Korean Journal of Agricultural Science*, Vol. 45, No. 3, pp. 447-454, 2018.
DOI: <http://doi.org/10.7744/kjoas.20180041>
- [27] AOAC. 2012. Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL, 19th edition.

[28] A. T. Adesogan, N. Krueger, M. B. Salawu, D. B. Dean, C. R. Staples, "The influence of treatment with dual purpose bacterial inoculants or soluble carbohydrates on the fermentation and aerobic stability of bermudagrass", *Journal of Dairy Science*, Vol. 87, No. 10, pp. 3407-3416, 2004.
DOI: [http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73476-1](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73476-1)

[29] D. B. Duncan, "Multiple range and multiple F test", *Biometrics*, Vol. 11, No. 1, pp. 1-6, 1955.

[30] M. P. Bryant, "Nutritional requirements of the predominant rumen cellulolytic bacteria", *Federation Proceedings*, Vol. 32, pp. 1809-1813, 1973.

[31] H. F. Woods, L. V. Eggleston, H. A. Krebs, "The cause of hepatic accumulation of fructose 1-phosphate on fructose loading", *Biochemical Journal*, Vol. 119, No. 3, pp. 501-510, 1970.
DOI: <http://doi.org/10.1042/bj1190501>

[32] R. Yair, M. S. Allen, "The effects of fructose and phosphate infusions on dry matter intake of lactating cows", *Journal of Dairy Science*, Vol. 100, No. 4, pp. 2651-2659, 2017.
DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12165>

[33] S. Kumar, B. P. Treloar, K. H. Teh, C. M. Mckenzie, G. Henderson, G. T. Attwood, S. M. Waters, M. L. Patchett, P. H. Janssen, "Sharpea and Kandleria are lactic acid producing rumen bacteria that do not change their fermentation products when co-cultured with a methanogen", *Anaerobe*, Vol. 54, pp. 31-38, 2018.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.07.008>

[34] A. Jayanegara, N. Yantina, B. Novandri, E. B. Laconi, Nahrowi, M. Ridla, "Evaluation of some insects as potential feed ingredients for ruminants: chemical composition, in vitro rumen fermentation and methane emissions", *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*, Vol. 42, No. 4, pp. 247-254, 2017.
DOI: <https://doi.org/10.14710/jitaa.42.4.247-254>

[35] D. P. Morgavi, E. Rathahao-paris, M. Popova, J. Boccard, K. F. Nielsen, H. Boudra, "Rumen microbial communities influence metabolic phenotypes in lambs", *Frontiers in Microbiology*, Vol. 6, pp. 1060, 2015.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01060>

[36] O. V. Sjaastad. "Determination and occurrence of histamine in rumen liquor of sheep", *Acta Veterinaria Scandinavica*, Vol. 8, pp. 50-70, 1967.

[37] J. A. Dain, A. L. Neal, R. W. Dougherty, "The occurrence of histamine and tyramine in rumen ingesta of experimentally over-fed sheep", *Journal of Animal Science*, Vol. 14, No. 4, pp. 930-935, 1955.
DOI: <https://doi.org/10.2527/jas1955.144930x>

[38] J. R. Carlson, R. G. Breeze. "Ruminal metabolism of plant toxins with emphasis on indolic compounds", *Journal of Animal Science*, Vol. 58, No. 4, pp. 1040-1049, 1984.
DOI: <https://doi.org/10.2527/jas1984.5841040x>

[39] P. Noziere, B. Graulet, A. Lucas, B. Martin, P. Grolier, M. Doreau. "Carotenoids for ruminants: From forages to dairy products", *Animal Feed Science and Technology*, Vol. 131, No. 3-4, pp. 418-450, 2006.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.06.018>

[40] T. F. O'Callaghan, R. Vazquez-Fresno, A. Serra-Cayuela,

E. Dong, R. Mandal, D. Hennessy, S. McAuliffe, P. Dillon, D. S. Wishart, C. Stanton, R. Paul Ross. "Pasture feeding changes the Bovine rumen and milk metabolome", *Metabolites*. Vol. 8, No. 2, pp. 27, 2018.
DOI: <https://doi.org/10.3390/metabo8020027>

엄준식(Jun-Sik Eom)

[정회원]



- 2017년 8월 : 경상대학교 응용생명과학부 (이학석사)
- 2017년 8월 ~ 현재 : 경상대학교 응용생명과학부 박사과정 중

<관심분야>

반추동물영양, 반추동물미생물, 반추동물대사

이신자(Shin-Ja Lee)

[정회원]



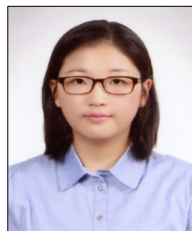
- 2003년 8월 : 경상대학교 낙농학과 (농학사)
- 2007년 8월 : 경상대학교 응용생명과학부(이학박사)
- 2012년 3월 ~ 2013년 2월 : 경북도립대학교 축산학과 교수(초빙교원)
- 2013년 1월 ~ 현재 : 경상대학교 농업생명과학연구원 학술연구교수

<관심분야>

반추동물영양, 반추동물미생물, 반추동물대사

이유경(You-Gyung Lee)

[정회원]



- 2016년 2월 : 경상대학교 응용생명과학전공(이학석사)
- 2012년 10월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 영양생리팀 농업연구사

<관심분야>

동물영양생리, 미생물

이 성 실(Sung-Sill Lee)

[정회원]



- 1995년 2월 : 서울대학교 동물자원 과학과 (농학박사)
- 1995년 9월 ~ 1997년 12월 : Canada Lethbridge Research center 박사 후 과정
- 1999년 2월 ~ 2002년 2월 : 국립 축산과학원 영양생리과 연구사
- 2002년 3월 ~ 현재 : 경상대학교 축산생명학과 교수

<관심분야>

반추동물영양, 반추동물미생물, 반추동물대사