

## 조사료와 농후사료 급여비율에 따른 젖소 우분의 대사체 탐색

김현상<sup>1</sup>, 이신자<sup>2</sup>, 엄준식<sup>1</sup>, 이성실<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>경상대학교 응용생명과학부(BK21Plus), <sup>2</sup>경상대학교 농업생명과학연구원(중점연구소)

## Research fecal metabolite according to fed different ratios of roughage to concentrate on lactating cow using <sup>1</sup>H-NMR analysis

Hyun Sang Kim<sup>1</sup>, Shin Ja Lee<sup>2</sup>, Jun Sik Eom<sup>1</sup>, Sung Sill Lee<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Division of Applied Life Science(BK21Plus), Gyeongsang National University

<sup>2</sup>Institute of Agriculture and Life Science & University-Centered Labs, Gyeongsang National University

**요약** 이 연구는 급여하는 조사료와 농후사료 비율을 달리하였을 때, 우분 내 대사체 비교를 핵자기공명장치로 확인하기 위해 실시되었다. 착유중인 젖소 6마리를 두 그룹으로 나누어 조사료와 농후사료 급여 비율(HR 그룹=8:2, HC 그룹=2:8)을 달리 하였다. 우분은 직장을 통해 마리별 1회 채취 하였으며 대사체 분석은 SPE-800 MHz NMR-MS system 을 이용하였다. 대사체의 정성 및 정량은 Chenomx NMR suite 8.4을 이용하였으며, 확인된 대사체들을 Metaboanalyst 4.0을 이용하여 다변량 분석, 대사경로 분석을 진행하였다. 통계분석은 SAS program을 이용하여 Dunnett's test로 그룹 간 대사체 평균값을 비교 하였다. 분석 결과, 다변량 분석에서는 그룹간의 분리가 확인 되었으며 확인된 대사체 중 통계분석에는 77개의 대사체가 이용되었다. HC 그룹에서 유의적으로 높았던 대사체는 succinate를 포함한 dimethylamine, histamine, homovanillate, thymol, acetate, propionate, butyrate, isovalerate, valerate, imidazole, N-Nitrosodimethylamine 그리고 O-Acetylcholine 이다. HC 그룹에서 분석된 대사체들의 평균 농도가 HR 그룹에 비해 높았으며, 분석된 대사경로 또한 HR 그룹에 비해 다양했다. 연구결과, 핵자기공명분광장치를 통해 분석한 우분 내 대사체는 장내 미생물 뿐 만 아니라 체내 대사 그리고 향후 축산 관련 다양한 연구에 유용하게 사용될 것으로 사료된다.

**Abstract** This study examined the metabolites in different roughage to concentrate ratios using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (<sup>1</sup>H-NMR). Six lactating cows were divided into two groups that were fed different roughage to concentrate ratios (HR group = 8:2, HC group = 2:8). Feces samples were collected individually at one time, and the metabolites were analyzed using an SPE-800 MHz NMR-MS system. The metabolites were identified and quantified using a Chenomx NMR suite 8.4. Metabolic pathway analysis and principal component analysis were conducted using a Metaboanalyst 4.0. Statistical analysis was performed using a Dunnett's test on the SAS program. As a result, several metabolites were identified, and among them, 77 metabolites were used in statistical analysis. The levels of twelve metabolites were significantly higher in the HC group: succinate, dimethylamine, histamine, homovanillate, thymol, acetate, propionate, butyrate, isovalerate, valerate, imidazole, N-nitrosodimethylamine, and O-acetylcholine. In the HC group, the concentrations of all metabolites were higher than in the HR group, and the metabolic pathway was also different. This study is expected to be useful for a variety of livestock studies by <sup>1</sup>H-NMR because it examined the change in metabolites in the body metabolism and microorganisms.

**Keywords** : Dairy Cow, Feces, Feeding Ratio, Metabolite, 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.)

email: lss@gnu.ac.kr

Received November 1, 2019

Revised December 24, 2019

Accepted February 7, 2020

Published February 29, 2020

## 1. 서론

국내 농림축산업의 연도별 총생산액 중 축산업이 차지하는 비율은 2010년대 초반 30%에서 현재까지 약 45%로 가파르게 증가하고 있다. 이는 사육시설의 규모화와 사육두수 증가 및 밀집 현상으로 귀결되어 축산업의 부정적 측면인 질병발생, 악취 및 토양과 수질 오염 등을 야기 시키고 있다 [1]. 이에 따라 정부에서는 축산분뇨 이용 및 관리에 관한 법률 (2013년 3월)을 제정하였고 따라 분뇨 처리에 관한 시설 연구, 액비 제조, 연료화를 통한 에너지원 활용 등 [2] 다양한 가축분뇨의 자원화 및 이용에 대한 연구가 진행되고 있다. 다양한 성분을 함유하고 있는 분의 가치 평가를 통해 화학비료의 대체제로 이용하기 위한 액비 연구가 활발히 진행되고 있다.

가축의 분은 섭취한 사료를 소화기관에서 소화 및 흡수 과정을 거친 후, 체내이용 되지 않은 물질이 대장으로 이동하게 된다. 대장에서는 소장과 같이 직접적인 효소 분비가 일어나지 않지만 장내에 생존하고 있는 미생물이 분비하는 효소에 의한 소화과정이 일어난다. 미생물들의 군집도에 따라 분 내에 대사체 변화가 일어나며, 급여사료 성분, 사양시기, 축사환경 등 여러 환경적 요소에도 영향을 받을 수 있다 [3]. 그러므로 가축이 배출하는 분 내의 대사체 연구가 필요하다.

대사체 분석기기는 여러 대사과정을 통해 직·간접적으로 영향을 주는 대사체를 확인하며 이러한 대사체를 바이오마커로 활용하여 예측 가능한 연구수행이 가능하다. 분석기기로는 Gas Chromatography (GC), Liquid Chromatography (LC) 및 High Performance Liquid Chromatography (HPLC) 등의 chromatography 계열의 기기가 널리 이용되고 있다 [4-7]. 위와 같은 기기 외 핵자기공명분광기 (Nuclear Magnetic Resonance, 이하 NMR)는 다른 대사체 분석기기에 비해 시료 내 다양한 대사체 확인이 가능하며 짧은 분석시간과 간단한 전처리과정을 통하여 효율적인 분석이 가능하며 다양한 형태의 시료 분석이 가능한 유용한 장비이다 [8]. 주로 이용되고 있는 분야로는 식품의 원산지 판별, 화합물의 구조 동정, 질환에 따른 체내 바이오마커 탐색 등 활발히 이용되고 있다.

국내 선행연구에서는 chromatography 계열 분석기기를 이용한 가축의 분 내 대사체 연구가 있었으며[9], 젖소의 반추위액, 우유 등의 대사체 분석에 대한 연구가 있었다 [10,11]. 하지만 NMR을 이용한 축산 분야 국내 연구는 미비한 실정이다.

그러므로 본 연구에서는 축산분야에서 대두되고 있는 우분을 이용하여 NMR 분석을 통한 우분 내 대사체를 분석하고 이 결과를 바탕으로 가축의 다양한 생체시료 연구 자료로써 활용하고자 한다.

## 2. 연구방법

### 2.1 공시동물 및 시료 채취

연구 절차 및 공시축의 사양관리는 국립축산과학원 축산자원개발부 복지 윤리법에 따라 수행되었으며, Holstein 6두 (평균체중 : 617±80 kg, 평균산차 : 1~2산)를 이용하였다. Holstein 3두는 이탈리아 라이그라스와 농후사료 급여비율을 8:2 (HR 그룹), 나머지 3두는 2:8 (HC 그룹)로 하여 1일 2회 급여하였으며, 물과 미네랄 블록은 자유채식 하였다. 급여 사료에 대한 내용은 Table 1과 같다. 우분 채취는 직장 내에 손을 넣어 1회 직접 채취하였으며 바로 -80 °C에 분석 전까지 보관하였다 [12].

Table 1. Chemical composition of roughage and concentrate

Item (% of DM)	Italian ryegrass	Concentrate
Moisture	7.40	11.2
Crude protein	5.60	15.00
Ether extract	0.84	2.00
Crude ash	4.84	12.00
Crude fiber	34.84	20.00
Ca	0.21	0.80
P	0.13	1.50
Acid detergent fiber	38.95	-
Neutral detergent fiber	66.54	-

### 2.2 NMR 전처리 및 분석

분석 전 시료의 전처리는 다음과 같다. 분석에는 pH 7.4의 Phosphate Buffer Solution (PBS)을 사용하였으며 추출을 용이하게 하기 위해 10 mL PBS에 25 mg NaCl을 첨가하였다. 기준물질은 3-(Trimethylsilyl) propionic-2,2,3,3-d 4 acid sodium salt (TSP)을 사용하였고 0.1% TSP를 Deuterium oxide (D<sub>2</sub>O)에 첨가하여 준비하였다. 수집된 우분 샘플 300 mg을 PBS 1 mL와 혼합 후 초음파 균질기로 15 분간 균질화 시킨 후 18,000 g의 속도로 20 분간 원심 분리 하였다. 그 후 상

층액 400  $\mu$ l를 150  $\mu$ l의 D<sub>2</sub>O로 희석시킨 후 원심 분리하여 상층액 550  $\mu$ l을 5 mm NMR tube에 옮겨 담아 준비하였다 [13].

전처리된 시료의 분석은 SPE-800 MHz NMR-MS system (Bruker, BioSpin, AG)을 이용하여 진행하였다. NMR spectrum은 NOESY 1D sequence를 사용하였으며 25°C에서 진행하였다. 기기의 측정 조건은 Relaxation delay = 2 s, Scan number : 128, Acquisition time : 2 s, Time domain : 64 k, Sweep width : 20 ppm로 진행하였다. 각 시료에 대하여 NMR 데이터를 얻은 후, Chenomx NMR suite 8.4 (Chenomx Inc., Edmonton, Alberta, Canada)를 사용하여 baseline과 phase를 동일하게 맞춘 후 정성 및 정량 분석을 수행하였다. 대사체의 분류는 BMDB version 1.0 (<http://bmdb.wishartlab.com>)을 통해 진행하였다.

### 2.3 통계분석

확인된 대사체들을 Metaboanalyst 4.0 (<https://www.metaboanalyst.ca>)에 업로드 후 PCA (Principal Component Analysis), PLS-DA (Partial Least Squares-Discriminant Analysis), metabolic pathway analysis를 진행하였으며 계산된 *p* 값이 0.05 미만일 경우 pathway가 유의한 것으로 간주하였다. 대사체 비교에는 Chenomx NMR suite 8.4 (Chenomx Inc., Edmonton, Alberta, Canada)을 이용하여 정성 및 정량값(평균 농도)을 구했으며, 통계적 유의성 검토는 SAS package program을 이용하여 Dunnett's test [14]로 그룹 간 값을 비교하여 *p*<0.05 이하의 경우 유의적인 차이가 있다고 판정하였다.

## 3. 연구결과 및 논의

조사료와 농후사료 급여비율이 다른 착유우의 우분의 대사체결과를 이용하여 PCA 및 PLS-DA 분석 결과는 Fig. 1 과 같다. PC 1과 2 score의 설명력은 48.8%와 17.2%로 전체 변이량의 48.8%를 반영하고 있음을 알 수 있었다. PCA score plot을 관찰한 결과, 조사료 급여비율이 높았던 HR 그룹에서 우측에 모여 있는 경향을 보였으며 농후사료 비율이 높았던 HC 그룹은 변이가 높은 것을 보였다.

확인된 대사체의 수는 HR 그룹에서는 110 ± 36개이고 HC 그룹에서는 146 ± 11개가 확인되었으며 유의성 검토에는 77개의 대사체가 이용되었다.

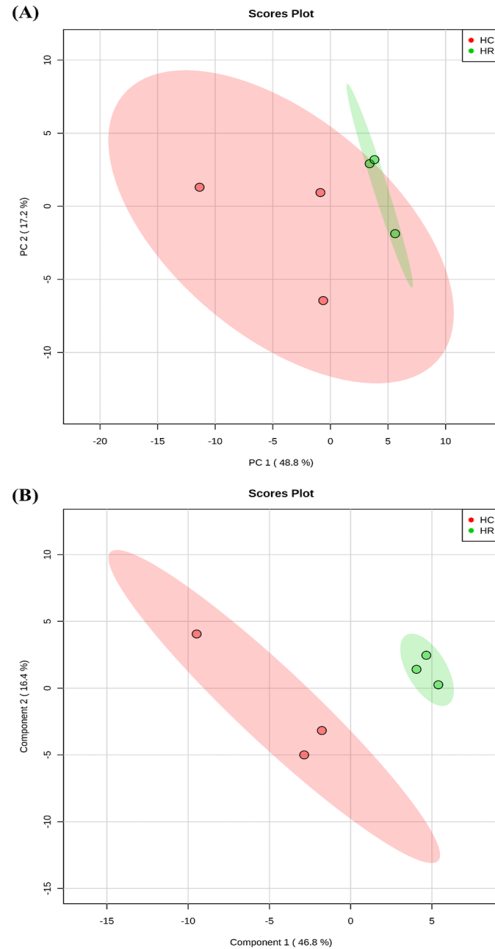


Fig. 1. PCA (A) and PLS-DA (B) of feces sample according to fed different ratios of roughage to concentrate on lactating cow. Ellipses and shapes show clustering of the samples.

우분에서 측정된 대사체들의 metabolic pathway를 분석한 결과는 Fig. 2. 와 같다. X축은 topological pathway 분석으로부터 계산된 경로 영향 값을 나타내고, Y축은 pathway enrichment 분석으로부터 얻어진 *p*-값의 로그이다. 가장 크게 변화된 경로는 높은 log (*p*) 값과 높은 영향 값을 가지며 오른쪽 상단으로 표기된다. 두 그룹에서 공통적으로 확인된 metabolic pathway는 glycine, serine and threonine metabolism, valine,

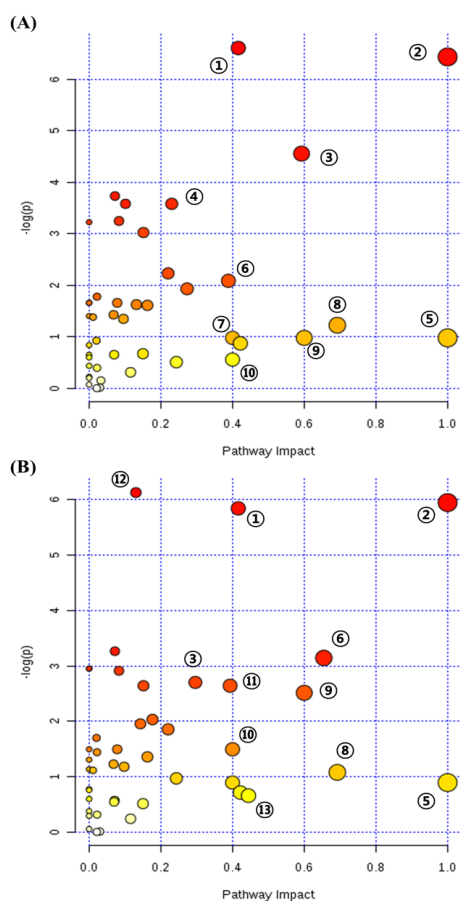


Fig. 2. Metabolic pathway analysis plot created using MetaboAnalyst 4.0. Plots depict several metabolic pathway in fecal according to fed different ratios of roughage to concentrate on dairy cow. (A) Fed the high ratio of roughage (HR), (B) Fed the high ratio of concentrate (HC). ① Glycine, serine and threonine metabolism, ② Valine, leucine and isoleucine biosynthesis, ③ Glyoxylate and dicarboxylate metabolism, ④ Citrate cycle (TCA cycle), ⑤ D-Glutamine and D-glutamate metabolism, ⑥ Histidine metabolism, ⑦ Biotin metabolism, ⑧ Caffeine metabolism, ⑨ Synthesis and degradation of ketone bodies, ⑩ Ascorbate and aldarate metabolism, ⑪ Alanine, aspartate and glutamate metabolism, ⑫ Butanoate metabolism, ⑬ beta-Alanine metabolism.

leucine and isoleucine biosynthesis, glyoxylate and dicarboxylate metabolism, galactose

metabolism, galactose metabolism, methane metabolism이었다. 그룹 간 차이를 나타낸 pathway는, HR 그룹에서 pentose and glucuronate interconversions, starch and sucrose metabolism 이었으며, HC 그룹에서는 beta-alanine metabolism, phenylalanine metabolism, propanoate metabolism, synthesis and degradation of ketone bodies, arginine and proline metabolism, caffeine metabolism, amino sugar and nucleotide sugar metabolism, tyrosine metabolism, glycolysis or gluconeogenesis, pentose phosphate pathway 및 histidine metabolism이었다. HC 그룹에서 유의성을 나타낸 pathway는 protein 관련 pathway가 주로 확인 되었으며 농후사료 급여가 높은 젖소의 우분에서 많은 변화가 있는 것을 확인 할 수 있었다.

Fig. 3은 PLS-DA 분석결과에 관련된 상위 25개의 대사체에 관하여 heatmap을 통해 시각화 하였다.

Table 2는 통계적인 비교분석이 가능한 대사체 77개를 carbohydrates, amines, amino acids, lipid, VFA (volatile fatty acid), alcohols, benzoic acids, carboxylic acids, imidazolinones, organic acids, indoles 및 others 계열로 분류한 결과이다.

계열 별 분석 결과를 살펴보면, carbohydrates 계열 대사산물은 15가지가 확인 되었으며 그 중 succinate가 HR 그룹에서 유의적( $p < 0.05$ )으로 낮았다. 이외에 glucose, lactose 및 pyruvate가 HR 그룹에서 농도가 높게 관찰되었지만 통계적 유의성( $p > 0.05$ )은 관찰되지 않았다. Succinate는 장내 미생물에 의한 탄수화물 발효 과정의 중간체이며 [15], glucose로부터 pyruvate를 거쳐 succinate를 통해 최종적으로 propionate를 생성하고 acetyl-co-A로부터 acetate, butyrate 및 ethanol이 생성되어 VFA 농도에 영향을 줄 수 있다. 그러므로 이번 연구에서도 HR 그룹에서 낮은 농도의 결과가 나타난 것으로 사료된다.

Amines 계열 대사산물 3가지, amino acids 계열 대사산물은 9가지, 그리고 lipids 계열 대사산물은 총 6가지가 확인 되었다. 이 중 amines 계열 dimethylamine 과 histamine이 HC 그룹에서 유의적( $p < 0.05$ )으로 높았다. Dimethylamine은 microbial choline catabolism 의 해 생성된 trimethylamine-N-oxide가 전변되어 생성되고 최종적으로 methylamine을 생성하게 된다. 또한 Saleem 등 [16]에 의하면 곡물사료 급여량이 증가함에

Table 2. Identified of fecal metabolites according to fed different ratios of roughage to concentrate using <sup>1</sup>H-NMR.

Metabolite ( $\mu\text{M/L}$ )	Diet <sup>1)</sup>		<i>p</i> value	SEM	Metabolite ( $\mu\text{M/L}$ )	Diet <sup>1)</sup>		<i>p</i> value	SEM
	HR	HC				HR	HC		
<b>Carbohydrates</b>					<b>Amino acids and derivatives</b>				
1,3-Dihydroxyacetone	0.25	1.53	0.2945	0.71	Glycine	7.57	6.57	0.8810	4.43
Acetoacetate	1.75	1.40	0.6644	0.49	Isoleucine	3.00	7.70	0.1153	1.66
Fructose	14.30	16.75	0.8001	6.01	Leucine	6.90	10.00	0.4422	2.47
Galactitol	7.05	6.15	0.7042	1.45	Methionine	2.70	5.30	0.3707	1.74
Galactonate	12.15	19.80	0.5747	8.57	Valine	6.80	10.17	0.6668	4.98
Galactose	27.60	26.53	0.9621	14.54	Xanthurenate	3.23	5.53	0.1573	0.94
Glucose	39.87	83.37	0.0897	13.80	<b>Lipids</b>				
Isocitrate	18.97	38.33	0.2262	9.58	Choline	3.17	2.75	0.8350	1.29
Lactose	16.80	48.75	0.2810	15.44	Ethylene glycol	0.70	0.93	0.6062	0.30
Mannose	9.80	7.50	0.6861	3.48	Methyl glutarate	2.65	2.75	0.9663	1.48
N-Acetylglucosamine	10.77	9.60	0.8376	3.77	Glycolate	2.30	1.30	0.5797	1.08
Pyruvate	1.15	7.73	0.2513	3.27	O-Acetylcarnitine	2.33	1.10	0.6299	1.62
Succinate	3.87*	5.37	0.0389	0.35	Thymol	1.60*	4.00	0.0378	0.56
Trehalose	5.20	6.93	0.7365	3.40	<b>Volatile fatty acid (mM)</b>				
Xylose	17.65	20.25	0.7178	4.42	Acetate	1.73*	5.10	0.0066	0.46
<b>Amines</b>					Propionate	0.33*	1.01	0.0011	0.06
Dimethylamine	0.27*	1.95	0.0013	0.10	Butyrate	0.10*	0.44	0.0025	0.04
Histamine	1.07*	2.90	0.0163	0.32	Isovalerate	0.03*	0.07	0.0207	0.01
Sarcosine	2.55	1.55	0.6179	1.21	Valerate	0.03*	0.18	0.0045	0.01
<b>Amino acids</b>					Isobutyrate	0.05	0.10	0.1826	0.02
Anserine	2.20	4.60	0.2085	1.13	<b>Imidazolinones</b>				
N-Phenylacetyl glycine	2.40	5.33	0.3760	1.99	Creatinine	3.13	3.80	0.7344	1.30
$\pi$ -Methylhistidine	1.80	4.00	0.1198	0.79	Imidazole	2.83*	5.87	0.0430	0.73
<b>Organic acids</b>					<b>Aliphatic acyclic compounds</b>				
Ferulate	1.27	1.15	0.7729	0.26	O-Phosphocholine	2.45	1.85	0.2318	0.25
Formate	16.83	13.47	0.2074	1.58	TMNO	0.67	0.30	0.5586	0.41
NDMA	2.20*	6.17	0.0388	0.93	<b>Benzoic acids</b>				
O-Acetylcholine	2.13 <sup>†</sup>	1.35	0.0073	0.08	3,4-DHPOP	0.80	4.27	0.3973	2.48
Phenylacetate	7.37	8.57	0.7478	2.46	3-Hydroxymandelate	6.50	6.87	0.8051	0.96
Succinylacetone	0.85	3.03	0.1566	0.82	4-HPA	3.27	10.40	0.0524	1.85
<b>Others</b>					Isoeugenol	2.00	3.15	0.3062	0.66
2-HPA	2.97	4.57	0.2849	0.92	o-Cresol	3.15	9.13	0.2518	2.97
3-Methylxanthine	0.40	0.57	0.1482	0.06	p-Cresol	1.50	2.63	0.4611	0.95
3-Phenylpropionate	10.35	31.87	0.1098	6.73	<b>Carboxylic acids</b>				
4-Pyridoxate	1.40	1.03	0.6701	0.55	3-Hydroxyisovalerate	0.77	3.37	0.2767	1.46
Butanone	2.75	12.23	0.1164	3.05	3-HPA	4.23	5.43	0.4114	0.93
Caffeine	1.07	1.90	0.3126	0.51	5-Aminolevulinate	5.53	17.23	0.2939	6.85
Dimethyl sulfone	0.70	2.00	0.2236	0.60	Glycylproline	8.50	34.13	0.3088	14.75
Ibuprofen	1.70	2.80	0.6348	1.47	Guanidoacetate	2.17	3.27	0.5687	1.25
Melatonin	2.20	3.33	0.5241	1.11	Homovanillate	2.07*	5.67	0.0286	0.76
N-Acetylserotonin	1.95	2.00	0.9632	0.68	Hydroxyacetone	1.60	3.77	0.5313	1.97
<b>Alcohols</b>					Malonate	2.05	2.47	0.5534	0.44
Ethanol	21.10	16.15	0.5502	5.19	N-Acetylaspartate	0.60	3.40	0.2228	1.13
<b>Indoles</b>					Pantothenate	2.80	4.77	0.5746	2.20
5-HIAA	1.90	2.60	0.4977	0.64					

<sup>1)</sup>HR: Roughage : Concentrate = 8:2, HC: Roughage : Concentrate = 2:8  
<sup>†</sup>Means with different superscripts in the same column differ significantly (*p*<0.05).  
 4-HPA: 4-Hydroxyphenylacetate, 3-HPA: 3-Hydroxyphenylacetate, 2-HPA: 2-Hydroxyphenylacetate, 3,4-DHPOP: 3,4-Dihydroxybenzeneacetate, TMNO: Trimethylamine N-oxide, 5-HIAA: 5-Hydroxyindole-3-acetate, NDMA: N-Nitrosodimethylamine

따라 반추위내 N-Nitrosodimethylamine, dimethylamine 등의 대사체들이 증가된다고 하였다. Lipids 계열 thymol은 HR 그룹에서 유의적( $p < 0.05$ )으로 낮았다. Thymol은 carvacrol과 함께 대표적인 식물 유래 오일의 구성요소로서 진핵생물에게는 독성으로 작용할 수 있으며 항균 및 항진균 활성을 나타낸다고 알려져 있다 [17,18]. 이번 연구에서는 VFA 계열 대사산물은 6가지가 확인되었으며 acetate, propionate 및 butyrate 순으로 농도가 높게 측정되었다.

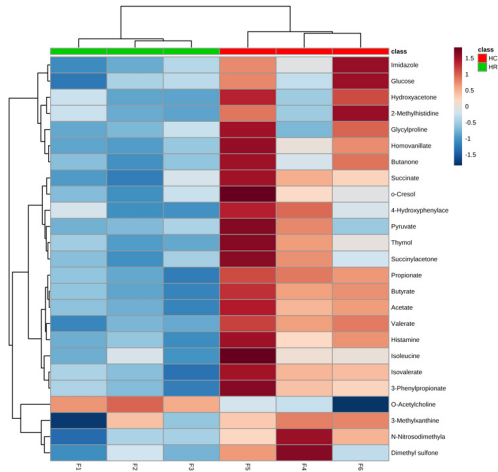


Fig. 3. Heatmap of feces sample according to fed different ratios of roughage to concentrate on lactating cow. Annotations on top 25 metabolite of the heatmap show clustering of the samples.

또한 isobutyrate를 제외한 나머지 VFA의 농도가 HC 그룹에서 유의적( $p < 0.05$ )으로 높았는데 이와 같은 결과는 반추위 내의 VFA 생성량이 높았을 뿐만 아니라 위벽으로 흡수되지 못하여 하부장기로 이동되는 양도 증가될 수 있기 때문에 이와 같은 결과가 도출된 것으로 사료되며 [19], 또한 Mao 등 [20]의 선행 연구결과와 유사하였다. 반추위 내 VFA는 탄수화물 유래 분해산물이며, 반추가축의 주요 에너지원으로 사용되는 물질이다. 반추위 미생물에 의해 섭취된 사료가 발효과정을 통하여 생성된 후 위벽으로 흡수되어 증체 및 유생산에 사용되는 전구물질이며 [21], 대장의 상피세포를 통해 흡수된다. 또한 Mao 등 [20]에 의하면 농후사료의 급여비율에 따라 우분을 분석한 결과, 급여수준이 높아짐에 따라 분내 VFA 농도가 증가하였다고 한다. 또한 VFA는 최소감지농도가 매우 낮은 물질로 알려져 있으며 양돈업에서는

분뇨의 주요한 냄새 원인으로도 알려져 있다 [22]. 그러므로 농후사료 급여비율을 높이면 반추동물의 증체량과 유생산이 증가될 수 있지만 분뇨의 냄새의 원인이 될 수 있는 단점이 있다.

그리고 carboxylic acids 계열 homovanillate, imidazoli-nones 계열 imidazole, 그리고 organic acids 계열 N-Nitr-osodimethylamine과 O-Acetylcholine 이 HC 그룹에서 유의적( $p < 0.05$ )으로 높았다. 이외에는 3,4-Dihydroxybenze-neacetate, 4-Hydroxyphenylacetate, o-Cresol, glycyIprolin-e, succinylacetone, 3-Phenylpropionate 및 butanone가 HR 그룹에서 높은 농도를 보였으나 통계적 유의성( $p > 0.05$ )은 나타나지 않았다. Homovanillate는 catechol O-methyltransferase를 통해 3,4-Dihydroxybenzeneacetate로부터 생합성 되는 대사체로서 소에서는 tyrosine metabolism pathway에 관여한다고 알려져 있다. p-cresol과 o-cresol은 이성질체이며 반추동물의 *Lactobacillus* 균주의 탈 카르복실화와 같은 메커니즘을 통해 tryptophan에서 유도된다고 한다 [15]. 또한 농후사료의 급여량이 증가하면 반추위 내에서 발효 및 소화과정을 통해 하부장기로 이동되어지는 단백질의 양이 증가하므로 이는 분내의 cresol과 같은 단백질 유래 대사체가 증가할 것으로 예상하였으나 분석결과 유의성( $p > 0.05$ )은 나타나지 않았다.

#### 4. 결론

NMR을 이용하여 사료급여 비율에 따른 우분을 분석하였을 때, 분류 내 대사체들의 변화가 다른 것을 알 수 있었으나 이러한 대사체들에 대한 유래 및 발생경로에 대한 정보는 아직 미비하다. 하지만 단순한 우분 내의 대사체의 프로파일링 뿐 만 아니라 연구의 목적에 따라 스크리닝까지 할 수 있는 장점을 보였다. 이번 연구에서는 NMR을 이용한 우분 내 대사체 분석을 진행하였으며 그 결과 기존의 우분을 이용한 선행연구결과와 비교해보았을 때 더 많은 대사체 측정에 용이한 것으로 판단된다. 그러므로 국내 축산 분야에서 활용성에 대한 가능성을 제시하였다고 사료된다. 추후 분석된 대사체의 종류와 농도에 관여하는 미생물 군집분석과의 상관관계에 대한 연구, 그리고 반추동물의 우분 채집 시간과 대사체 농도 변화에 대한 표준화된 연구 자료가 누적되어야 할 것이다.

## References

- [1] D. H. Kim, I. B. Lee, D. Y. Choi, J. I. Song, J. H. Jeon, D. M. Ha. "A Survey on Current State of Odor Emission and Control from Livestock Operations", *Journal of Animal Environmental Science*, Vol.19, No.2, pp.123-132, Dec. 2013.  
DOI: <https://doi.org/10.11109/JAES.2013.19.2.123>
- [2] C. W. Song, N. C. Kim, J. K. Ryu, J. M. Kim. "A study on the fuelization of livestock sludge using thermal hydrolysis", *Journal of Korea Organic Resource Recycling Association*, Vol.23, No.3, pp.51-59, Sep. 2015.  
DOI: <https://doi.org/10.17137/korrae.2015.23.3.051>
- [3] P. D. Le, A. J. A. Aarnink, N. W. M. Ogink, P. M. Becker, M. W. A. Verstegen. "Odour from animal production facilities: its relationship to diet", *Nutrition Research Reviews*, Vol.18, No.1, pp.3-30, Jun. 2005.  
DOI: <https://doi.org/10.1079/NRR200592>
- [4] S. H. Seo, S. E. Park, E. J. Kim, D. H. Youn, Y. M. Lee, S. Y. Lee, S. H. Bok, D. H. Park, C. S. Seo, S. H. Byun, K. Y. Jun, D. S. Kim, C. S. Na, H. S. Son, "GC/MS-based metabolomics approach to evaluate the effect of jackyagkamcho-tang on acute colitis", *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Vol.2019, Article ID 4572764, Jan. 2019.  
DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/4572764>
- [5] Y. Mu, X. Lin, Z. Wang, Q. Hou, Y. Wang Z. Hu, "High-production dairy cattle exhibit different rumen and fecal bacterial community and rumen metabolite profile than low-production cattle", *MicrobiologyOpen*, Vol.8, No.4, pp.e00673, Apr. 2019.  
DOI: <https://doi.org/10.1002/mbo3.673>
- [6] N. Sillner, A. Walker, D. Hemmler, M. Bazanella, S. S. Heinzmann, D. Haller, P. Schmitt-Kopplin, "Milk-derived amadori products in feces of formula-fed infants", *Agricultural and Food Chemistry*, Vol.67, No.28 pp.8061-8069, Jun. 2019.  
DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b01889>
- [7] J. Fiori, S. Turrioni, M. Candela, R. Gotti, "Assessment of gut microbiota fecal metabolites by chromatographic targeted approaches (Review)", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol.177, No.2020, pp.112867, Sep. 2019.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.112867>
- [8] S. H. Kim, S. O. Yang, K. H. Kim, Y. S. Kim, K. H. Liu, Y. R. Yoon, D. Lee, C. H. Lee, G. S. Hwang, M. W. Chung, K. H. Choi, H. K. Choi. "Research trends, applications, and domestic research promotion strategies of metabolomics", *The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering*, Vol.24, No.2, pp.113-121, Jun. 2009.  
DOI: <https://www.earticle.net/Article/A110997>
- [9] K. Y. Park, M. C. Kim, K. L. Woo, N. K. Lee, H. D. Paik, "Rapid analysis of major putrefactive metabolites by GC and GC/MSD", *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal*, Vol.18, No.1, pp.74-77, Feb. 2003.  
DOI: <https://www.earticle.net/Article/A101219>
- [10] J. S. Eom, S. J. Lee, Y. G. Lee, S. S. Lee. "Comparison of volatile fatty acids, monosaccharide analysis and metabolic profiling in rumen fluid according to feeding methods", *Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society*, Vol. 19, No. 12, pp 814-824. Dec. 2018.  
DOI: <https://doi.org/10.5762/KAIS.2018.19.12.814>
- [11] J. S. Eom, S. J. Lee, S. K. Lee, Y. J. Lee, H. S. Kim, Y. Y. Choi, K. S. Ki, H. Y. Jeong, E. T. Kim, S. S. Lee, C. D. Lee, S. S. Lee. "Effects of different roughage to concentrate ratios on the changes of productivity and metabolic profiles in milk of dairy cows", *Korean Journal of Organic Agriculture*, Vol.27, No.2, pp 147-160. May 2019.  
DOI: <https://dx.doi.org/10.11625/KJOA.2019.27.2.147>
- [12] O. Deda, A. C. Chatziioannou, S. Fasoula, D. Palachanis, N. Raikos, G. A. Theodoridis, H. G. Gika, "Sample preparation optimization in fecal metabolic profiling", *Journal of Chromatography B*, Vol.1047, No.15, pp.115-123, Mar. 2017.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.06.047>
- [13] B. K. Kim, C. B. Choi, S. O. Lee, K. H. Baek, D. J. Jung, E. G. Hwang "Effects of supplementing herbs on growth performances, blood composition and diarrhea in Hanwoo calves", *Journal of Animal Science and Technology*, Vol.53, No.5, pp.451-459, Oct. 2011.  
DOI: <https://doi.org/10.5187/JAST.2011.53.5.451>
- [14] C. W. Dunnett. "A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control", *Journal of the American Statistical Association*, Vol.50 No.272, pp.1096-1121. Apr. 1955  
DOI: <https://doi.org/10.1080/01621459.1955.10501294>
- [15] M. T. Yokoyama, J. R. Carlson, "Production of Skatole and para-Cresol by a Rumen *Lactobacillus* sp.", *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.41, No.1, pp.71-76, Jan. 1981.  
DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.41.1.71-76.1981>
- [16] 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.6604-6623, Nov. 2012.  
DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5403>
- [17] M. Friedman, "Chemistry and multibeneficial bioactivities of carvacrol (4-isopropyl-2-methylphenol), a component of essential oils produced by aromatic plants and spices", *Journal of agricultural and food chemistry*, Vol.62, No.31, pp.7652-7670, Jul. 2014.  
DOI : <https://doi.org/10.1021/jf5023862>
- [18] A. Sivropoulou, E. Papanikolaou, C. Nikolaou, S. Kokkini, T. Lanaras, M. Arsenakis, "Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol.44, No.5. pp.1202-1205, May. 1996.

DOI: <https://doi.org/10.1021/af950540t>

- [19] Y. J. Chen, O. S. Kwon, B. J. Kim, K. S. Shon, J. H. Cho, I. H. Kim, "The effects of dietary biotite V supplementation on growth performance, nutrients digestibility and fecal noxious gas content in finishing pigs", *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, Vol.18, No.8, pp.1147-1152, Dec. 2005.  
DOI: <https://doi.org/10.5713/ajas.2005.1147>
- [20] S. Mao, R. Zhang, D. Wang, W. Zhu, "The diversity of the fecal bacterial community and its relationship with the concentration of volatile fatty acids in the feces during subacute rumen acidosis in dairy cows", *BMC Veterinary Research*, Vol.8, pp.237, Dec. 2012.  
DOI: <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/8/237>
- [21] D. N. Miller, V. H. Varel, "In vitro study of the biochemical origin and production limits of odorous compounds in cattle feedlots", *Journal of Animal Science*, Vol.79, No.12, pp.2949-2956, Dec. 2001.  
DOI: <https://doi.org/10.2527/2001.79122949x>
- [22] D. N. Miller, V. H. Varel, "Swine manure composition affects the biochemical origins, composition, and accumulation of odorous compounds", *Journal of Animal Science*, Vol.81, No.9, pp.2131-2138, Sep. 2003.  
DOI: <https://doi.org/10.2527/2003.8192131x>

**김 현 상(Hyun-Sang Kim) [정회원]**



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

<관심분야>  
반추동물영양, 반추동물미생물, 반추동물대사

**이 신 자(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

**엄 준 식(Jun-Sik Eom) [정회원]**



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

<관심분야>  
반추동물영양, 반추동물미생물, 반추동물대사

**이 성 실(Sung-Sill Lee) [정회원]**



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

<관심분야>  
반추동물영양, 반추동물미생물, 반추동물대사