

# 양성자 핵자기공명분광기를 이용한 고온스트레스에 따른 Holstein 수소의 반추위액과 혈액 내 대사체 프로파일링 연구

엄준식<sup>1</sup>, 이신자<sup>1,2</sup>, 이상석<sup>3</sup>, 서성원<sup>4</sup>, 박성민<sup>5</sup>, 이성실<sup>1,2,6\*</sup>

<sup>1</sup>경상국립대학교 농업생명과학연구원, <sup>2</sup>경상국립대학교 중점연구소,  
<sup>3</sup>순천대학교 동물자원과학과 반추영양 및 혐기미생물연구실, <sup>4</sup>충남대학교 농업생명과학대학 동물자원과학부,  
<sup>5</sup>농촌진흥청 국립축산과학원 낙농과, <sup>6</sup>경상국립대학교 응용생명과학부(BK21)

## Metabolic Profiling of Rumen fluid and Serum in Holstein Steers Exposure by Heat-Stressed Using Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

Jun Sik Eom<sup>1</sup>, Shin Ja Lee<sup>1,2</sup>, Sang Suk Lee<sup>3</sup>, Seongwon Seo<sup>4</sup>,  
Seong Min Park<sup>5</sup>, Sung Sill Lee<sup>1,2,6\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University

<sup>2</sup>University-Centered Labs, Gyeongsang National University

<sup>3</sup>Ruminant Nutrition and Anaerobe Laboratory, Department of Animal Science and Technology,  
Suncheon National University

<sup>4</sup>Division of Animal and Dairy Sciences, College of Agriculture and Life Science, Chungnam National University

<sup>5</sup>Dairy Science Division, National Institute of Animal Science, Rural Development Administration

<sup>6</sup>Division of Applied Life Science (BK21), Gyeongsang National University

**요약** 이번 연구는 양성자 핵자기공명분광기를 이용하여 고온스트레스에 따른 Holstein 수소의 반추위액과 혈액 내 대사체 프로파일링을 실시하였다. 실험동물은 Holstein 수소 6마리를 이용하였다. 반추위액과 혈액은 적온기(OTP, THI : 64.92)와 고온기(HTP, THI : 79.13)환경에서 아침 사료 급여 전 각각 채취하였다. 샘플들의 대사체는 proton nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H-NMR) spectroscopy를 이용하여 분석하였다. 대사체들의 정성 및 정량화는 Chenomx NMR Suite 8.4 software를 이용하여 실시하였다. 통계분석은 Metaboanalyst 5.0 program을 이용하여 *t*-test, principal component analysis, partial least square-discriminant analysis 및 variable importance in projection scores 결과를 도출하였다. 반추위액에서는 riboflavin이 OTP group에서, betaine과 succinate는 HTP group에서 유의적( $p < 0.05$ )으로 높았다. Glucose-1-phosphate와 acetate는 OTP group에서 유의적으로 높은 경향( $0.05 \leq p < 0.1$ )을 보였다. 혈액에서는 methanol과 sn-glycero-3-phosphocholine은 OTP group에서, 5-methoxysalicylate와 *N*-nitrosodimethylamine은 HTP group에서 유의적( $p < 0.05$ )으로 높았다. Pyruvate, acetoacetate, lactate 및 3-hydroxybutyrate는 HTP group에서 유의적으로 높은 경향( $0.05 \leq p < 0.1$ )을 보였다. 이번 연구의 대사체 결과들은 추후 Holstein 수소의 고온스트레스 진단을 위한 bio-marker 탐색 연구 자료로 활용 할 수 있을 것으로 생각된다.

**Abstract** This study was undertaken to determine the metabolic profiling of rumen fluid and serum in Holstein steers exposed to heat-stress. Analysis was achieved by applying proton nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H-NMR) spectroscopy. A total of 6 Holstein steers were used in this study. Rumen fluid and serum were collected in the optimum temperature period before morning feed intake (OTP, THI: 64.92), and in the high temperature period (HTP, THI: 79.13). Sample metabolites were analyzed using <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy, and identified and quantified using the Chenomx NMR suite 8.4 software. Statistical analysis was achieved by applying *t*-test, principal component analysis, partial least square-discriminant analysis and variable importance in projection scores data, using the Metaboanalyst 5.0 program. Riboflavin in the rumen fluid was significantly ( $p < 0.05$ ) higher in the OTP group, whereas betaine and succinate were significantly ( $p < 0.05$ ) higher in the HTP group. Glucose-1-phosphate and acetate showed an increasing tendency ( $0.05 \leq p < 0.1$ ) in the OTP group. Serum analysis revealed significantly higher levels of methanol and sn-glycero-3-phosphocholine ( $p < 0.05$ ) in the OTP group, whereas the HTP group had significantly higher ( $p < 0.05$ ) levels of 5-methoxysalicylate and *N*-nitrosodimethylamine. Pyruvate, acetoacetate, lactate and 3-hydroxybutyrate showed a tendency ( $0.05 \leq p < 0.1$ ) to be higher in the HTP group. We believe that results of this study will provide a reference for future studies aimed towards the discovery of heat stress bio-markers in Holstein steers.

**Keywords** : Biofluids, Chenomx NMR Suite 8.4 Software, Metaboanalyst 5.0 Program, Ruminants, Temperature Humidity Index

본 논문은 농촌진흥청 연구사업(과제번호:PJ014250)의 지원을 받아 수행되었음

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

email: lss@gnu.ac.kr

Received December 10, 2021

Revised December 28, 2021

Accepted January 7, 2022

Published January 31, 2022

## 1. 서론

여름철 고온스트레스는 반추동물의 생산성 저하 뿐 아니라 여러 대사성질환(acidosis, ketosis 등)을 유발시킬 수 있어 축산업의 경제적 손실을 초래 할 수 있다. 온·습도 지수(THI: Temperature Humidity Index, 이하 THI)가 평균 약 72 이상이면 고온스트레스 환경이라 하며[1], 반추동물이 고온스트레스에 노출되면 사료섭취량의 감소, 심장박동수와 직장온도가 증가하게 된다[2]. 특히 착유우의 경우에는 우유 생산량 및 성분 그리고 번식 능력이 감퇴 될 수 있다[3,4]. 그러므로 고온스트레스에 노출된 반추동물을 진단 할 수 있는 연구가 필요한 실정이다.

대사체학이란? 세포와 체액 내 대사체와 대사경로를 분석하는 생물학적 연구 분야이며, 사람을 포함한 여러 동·식물에 대한 연구가 활발히 진행 중에 있다[5,6]. 대표적인 대사체 분석기기로는 nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) 및 gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)등이 있다. Nuclear magnetic resonance spectroscopy는 LC-MS와 GC-MS보다 분자량이 작은 대사체 측정은 어렵지만 적은 시료량, 짧은 분석시간, 저렴한 분석비용 등의 장점으로 대사체 연구에 널리 쓰이고 있다[7-9].

국외에서는 반추동물의 체액(반추위액, 혈액, 뇨 등) 내 대사체를 분석하여 고온스트레스 bio-marker 탐색 연구가 활발히 진행 중에 있다. 발표된 선행연구 사례를 살펴보면 반추위액 내 휘발성지방산(VFA: Volatile Fatty Acid, 이하 VFA) [10], 혈액(serum 또는 plasma) 내 아미노산[11], 뇨 내 oxidative stress 관련 대사체 [12] 변화 등이 있다.

국내의 반추동물 대사체 연구로는 proton NMR ( $^1\text{H-NMR}$ ) spectroscopy를 이용하여 한우와 Holstein 착유우의 체액 내 대사체 분석[13-15], subclinical ketosis가 유발된 Holstein 착유우의 반추위액과 우유 내 대사체 변화 비교 연구[16] 등이 있다. 고온스트레스에 관한 연구로는 Holstein과 Jersey 종의 반추위 내 미생물 균총 변화[17,18], 호흡수, 직장온도, 반추활동 시간 및 혈액성상 변화[19,20] 연구 등이 수행되었으나 체액 내 대사체 연구는 매우 미비한 실정이다.

그러므로 이번 연구는 온·습도 환경변화(적온기와 고온기)에 따른 Holstein 수소의 반추위액과 혈액 내 대사체를  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopy를 이용하여 분석하고,

Metaboanalyst 5.0 program을 이용한 통계 결과를 도출하여 대사체 프로파일링 및 비교 분석을 실시하였다.

## 2. 연구방법

### 2.1 실험동물 및 사양관리

연구 절차 및 실험동물의 사양관리는 국립순천대학교 동물 복지 윤리법에 따라 수행하였으며 Holstein 수소 6마리를 이용하였다(연구윤리승인번호: SCNU-IACUC-2020-06). 실험동물에게 급여한 사료는 total mixed ration (TMR)로 자유 채식하였으며, 급여한 사료의 성분조성과 일반성분 분석결과는 Table 1과 같다. Dry matter (Method no. 934.01), crude protein (Method no. 976.05), crude fat (Method no. 920.39), ash (Method no. 942.05), calcium (Method no. 927.02) 및 phosphorus (Method no. 3964.06)는 Association of Official Analytical Communities 방법을 이용[21,22], neutral detergent fiber와 acid detergent fiber는 Van Soest 등의 방법 [23]을 이용하여 분석하였다.

### 2.2 반추위액 및 혈액 채취

반추위액과 혈액은 THI 지수를 고려하여 적온기 (OTP; optimum temperature period, 이하 OTP)와 고온기 (HTP; high temperature period, 이하 HTP)환경에서 각각 채취하였다. Temperature humidity index는 Tucker 등의 방법으로[24] 약 18일간 측정하여 환산하였으며, OTP와 HTP group의 THI 값은 각각  $64.92 \pm 0.56$  (mean  $\pm$  standard error of the mean)와  $79.13 \pm 0.56$ 의 수치를 보였다.

Optimum temperature period와 HTP group의 Holstein의 체중은 각각  $761.33 \pm 13.78$  kg과  $774.00 \pm 19.48$  kg이었으며, 직장온도는 각각  $40.07 \pm 0.20$  °C와  $40.63 \pm 0.14$  °C로 측정되었다.

반추위액은 stomach tube를 이용하여 오전 사료 급여 전에 채취하였다. 반추위액은 50 mL conical tube에 옮겨 담은 후  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopy 분석 전 까지  $-80$  °C에 보관하였다.

혈액은 오전 사료 급여 전 경정맥을 통해 채취하여 procoagulation 10 mL tube에 옮겨 담았다. 4 °C가 유지되는 centrifuge에서 3,000 rpm의 속도로 15분 간

원심분리 하여 혈청을 eppendorf tube (e-tube)에 1 mL씩 옮겨 담은 후 <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy 분석 전 까지 -80 °C에 보관하였다.

### 2.3 대사체 분석을 위한 반추위액 및 혈청의 전처리

반추위액은 4 °C가 유지되는 centrifuge에서 3,000 rpm의 속도로 15분 간 원심분리 하여 부유중인 사료 입자를 제거 한 후 12,000 rpm의 속도로 10분 간 재 원심분리 하여 상층액 350 μL를 채취하였다. 기준물질인 3-(Trimethylsilyl)propionic-2,2,3,3-d4 acid (TSP)는 deuterium oxide (D<sub>2</sub>O) solvent에 녹여 0.4 mM로 만들어 350 μL를 취한 후 반추위액의 상층액과 혼합하여 총액 내 TSP 농도를 0.2 mM로 만들어 5 mm NMR tube에 옮겨 담은 후 측정하였다[25].

혈청은 4 °C에서 해동 시킨 후 4 °C가 유지되는 centrifuge에서 12,500 rpm의 속도로 15분 간 원심분리 하여 상층액 200 μL를 새로운 e-tube에 옮겨 담았다. 그 후 100 % D<sub>2</sub>O solvent에 NaCl 농도가 0.9 % weight / volume인 saline solution을 만들어 혈청이 들어 있는 e-tube에 400 μL를 첨가하여 5 mm NMR tube에 옮겨 담은 후 측정하였다[26].

Table 1. Chemical composition of total mixed ration

Ingredients	Composition (% of DM)
Corn gluten feed	8.40
Soybean	6.24
Beet pulp	4.20
Wheat bran	3.15
Corn flakes	2.21
Molasses	1.04
Rice wine residue	5.25
Brewer's grain residue	21.01
Annual ryegrass straw	27.29
Orchard grass straw	21.01
Limestone	0.10
Sodium bicarbonate	0.01
Salt	0.09
Total	100
Chemical composition	% [dry matter (DM) basis]
Dry matter (fresh basis)	55.32
Crude protein	13.51
Crude fiber	22.12
Crude fat	3.16
Ash	9.22
Calcium	1.54
Phosphorus	0.58
Neutral detergent fiber	49.12
Acid detergent fiber	25.80

### 2.4 대사체 분석 및 통계 분석

대사체 분석은 SPE-800 MHz NMR-MS spectrometer (Bruker, BioSpin, AG, Fällanden, Switzerland)를 이용하여 진행하였다. <sup>1</sup>H-NMR spectrum은 반추위액과 혈청에서 각각 NOESY 1D sequence와 Carr-Purcell-Meiboom-Gill pulse 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 ppm으로 진행하였다[27].

분석된 spectrum들은 Chenomx NMR suite 8.4 (Chenomx Inc., Edmonton, Alberta, Canada) program의 Chenomx process를 이용하여 baseline과 phase를 샘플 간 동일하게 맞췄으며 그 후 Chenomx profiler를 이용하여 대사체들의 정성 및 정량 분석을 수행하였다.

대사체들의 통계 분석은 R-software 기반인 Metaboanalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca>) program을 이용하여 *t*-test, principal component analysis (PCA), partial least square-discriminant analysis (PLS-DA) 및 variable importance in projection (VIP) score 결과를 도출하였다. *t*-test 결과의 *p*<0.05와 VIP score 1.5 이상의 값을 보인 대사체들은 두 group간 유의적 차이가 있는 것으로 간주하였고, 0.05≤*p*<0.1과 VIP score 1.0 이상의 값을 보인 대사체들은 두 group간 유의적 경향을 보인 것으로 간주하였다.

## 3. 결과

### 3.1 온·습도 환경변화에 따른 반추위액 내 대사체 변화

온·습도 환경변화에 따른 OTP와 HTP group의 반추위액 내 분석된 대사체를 이용한 PCA 결과는 Fig. 1과 같다. PC 1과 2 score에 설명력은 각각 17.9 %와 13 %이며, 두 group간 겹치는 경향을 보였다.

Fig. 2는 PLS-DA 결과이며, component 1과 2는 각각 17.5 %와 9.5 %로 OTP group이 HTP group에 비해 측정된 대사체들의 농도 변이가 적은 것을 확인할 수 있었다.

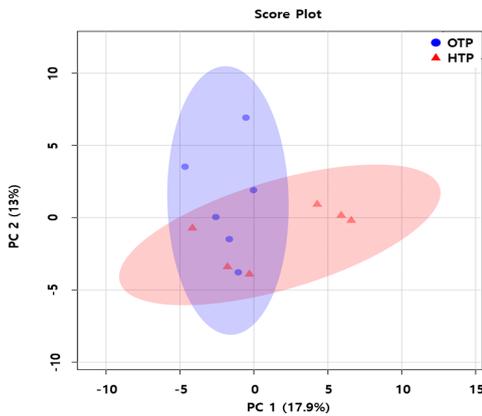


Fig. 1. Principal component analysis score plot based on rumen fluid metabolites data in optimum temperature period (OTP) and high temperature period (HTP) group by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy analysis (n=6). On the score plot, represents an individual samples, with the blue circle representing the OTP, and the red triangle representing the HTP group. The abscissa and represent the variance associated with PC 1 and 2, respectively.

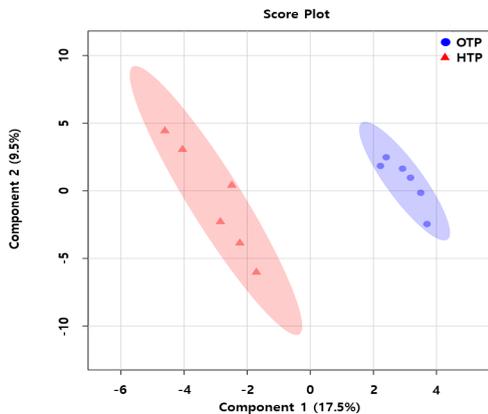


Fig. 2. Partial least square-discriminant analysis score plot of rumen fluid with optimum temperature period (OTP) and high temperature period (HTP) group by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy analysis (n=6). The shaded ellipses represent the 95% confidence interval estimated from the score. On the score plot, each represents and individual samples, with the blue circle representing the OTP, and the red triangle representing the HTP group. The abscissa and ordinate represent the variance associated with component 1 and 2, respectively.

*t*-test를 기반으로 한 OTP와 HTP group의 반추위 액 내 대사체 비교 결과는 Table 2와 같다. 두 group간 유의적( $p < 0.05$ )차이를 보인 대사체들은 총 16개였으며, 그 중 pyridoxine, *N*-phenylacetyl glycine, caprylate, acetoacetate, riboflavin, malonate, lactulose 및 benzoate는 OTP group에서, 4-hydroxy-3-methoxymandelate, *O*-acetylcholine, *N*-acetylserotonin, betaine, 2-hydroxybutyrate, 3,4-dihydroxybenzeneacetate, 2-hydroxy-3-methylvalerate 및 succinate는 HTP group에서 유의적( $p < 0.05$ )으로 높았다. 유의적 경향 ( $0.05 \leq p < 0.1$ )을 보인 대사체들은 총 11개였으며, 그 중 acetylsalicylate, glucose-1-phosphate, acetate 및 theophylline는 OTP group에서, methanol, 2-hydroxyphenylacetate, 3-phenyllactate, glycolate, 3-methylhistidine, 2-hydroxyisovalerate 및 azelate는 HTP group에서 유의적으로 높은 경향( $0.05 \leq p < 0.1$ )을 보였다.

Variable importance in projection을 기반으로 한 OTP와 HTP group의 반추위액 내 대사체 비교 결과는 Fig. 3과 같다. 총 20개의 대사체들이 VIP score 값 1.5 이상으로 확인 되었으며, 그 중 *N*-phenylacetyl glycine, pyridoxine, caprylate, acetoacetate, riboflavin, acetylsalicylate, lactulose, malonate 및 3-hydroxyphenylacetate는 OTP group에서, 4-hydroxy-3-methoxymandelate, *O*-acetylcholine, succinate, *N*-acetylserotonin, 2-hydroxyisovalerate, glycolate, betaine, 2-hydroxy-3-methylvalerate, 4-methylhistidine, azelate 및 methanol은 HTP group에서 비교적 높은 VIP score 값을 보였다.

### 3.2 온·습도 환경변화에 따른 혈청 내 대사체 변화

온·습도 환경변화에 따른 OTP와 HTP group의 혈청 내 분석된 대사체를 이용한 PCA 결과는 Fig. 4와 같다. PC 1과 2 score에 설명력은 각각 18.5%와 15.4%이며, 두 group간 약간 겹치는 경향을 보였다.

Fig. 5는 PLS-DA 결과이며, component 1과 2는 각각 14.9%와 8.9%로 OTP group이 HTP group에 비해 측정된 대사체들의 농도 변이가 큰 것을 확인 할 수 있었다.

*t*-test를 기반으로 한 OTP와 HTP group의 혈청 내 대사체 비교 결과는 Table 3과 같다. 두 group간 유의적( $p < 0.05$ )차이를 보인 대사체들은 총 12개였으며, 그 중 methanol, sn-glycero-3-phosphocholine, erythritol

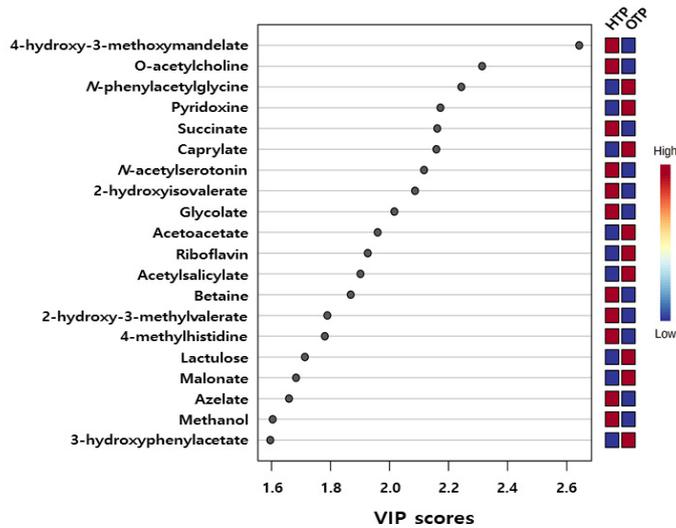


Fig. 3. Variable importance in projection (VIP) scores of rumen fluid metabolites in optimum temperature period (OTP) and high temperature period (HTP) by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy analysis (n=6). The selected metabolites were those with VIP score > 1.5. The heat map with red or blue squares on the right indicates high and low abundance ratio, respectively, of the corresponding rumen fluid metabolites in OTP and HTP groups. The VIP score was based on the partial least square-discriminant analysis model.

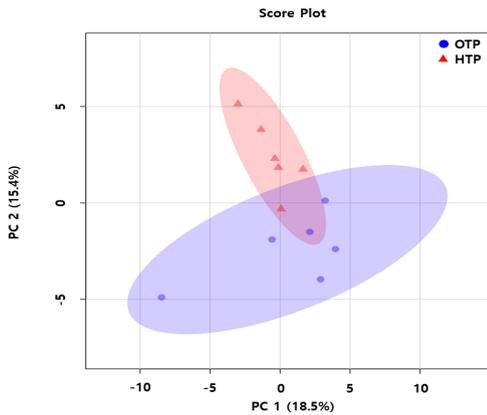


Fig. 4. Principal component analysis score plot based on serum metabolites data in optimum temperature period (OTP) and high temperature period (HTP) group by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy analysis (n=6). On the score plot, represents an individual samples, with the blue circle representing the OTP, and the red triangle representing the HTP group. The abscissa and represent the variance associated with PC 1 and 2, respectively.

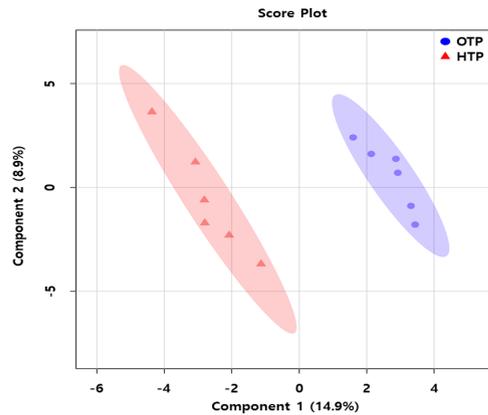


Fig. 5. Partial least square-discriminant analysis score plot of serum with optimum temperature period (OTP) and high temperature period (HTP) group by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy analysis (n=6). The shaded ellipses represent the 95% confidence interval estimated from the score. On the score plot, each represents and individual samples, with the blue circle representing the OTP, and the red triangle representing the HTP group. The abscissa and ordinate represent the variance associated with component 1 and 2, respectively.

및 cellobiose는 OTP group에서, 5-methoxysalicylate, N-nitrosodimethylamine, tartrate, sarcosine, N-methylhydantoin, glutathione, gallate 및 ethylene glycol은 HTP group에서 유의적(p<0.05)으로 높았다. 유의적 경향(0.05≤p<0.1)을 보인 대사체들은 총 14개였으며, 그 중 O-acetylcholine, glycyproline 및 tyrosine은 OTP group에서, UDP-N-acetylglucosamine, N-phenylacetyl glycine, pyruvate, isocaproate, acetoacetate, lactate, N-acetylaspartate, 3-hydroxybutyrate (BHBA), succinate, isoeugenol 및 alanine은 HTP group에서 유의적으로 높은 경향(0.05≤p<0.1)을 보였다.

Variable importance in projection을 기반으로 OTP와 HTP group의 혈청 내 대사체 비교 결과는 Fig. 6과 같다. 총 20개의 대사체들이 VIP score값 1.5 이상으로 확인 되었으며, 그 중 methanol, erythritol, sn-glycero-3-phosphocholine, O-acetylcholine, glycyproline 및 cellobiose는 OTP group에서, 5-methoxysalicylate, sarcosine, N-methylhydantoin, N-nitrosodimethylamine, pyruvate, acetoacetate, tartrate, glutathione, N-acetylaspartate, succinate, isoeugenol, N-phenylacetyl glycine, ethylene glycol 및 gallate는 HTP group에서 비교적 높은 VIP score값을 보였다.

Table 2. Differential enrichment of metabolites content of Holstein steers rumen fluid between optimum temperature period (OTP) and high temperature period (HTP) group (n=6)

Metabolites	Classification	Tendency <sup>1)</sup>	p value <sup>2)</sup>	VIP <sup>3)</sup>	FC <sup>4)</sup>
Pyridoxine	<i>Others</i>	▼	**	2.17	0.15
N-phenylacetyl glycine	<i>Amino acids</i>	▼	**	2.24	0.24
4-hydroxy-3-methoxymandelate	<i>Benzoic acids</i>	▲	**	2.64	11.76
Caprylate	<i>Lipids</i>	▼	**	2.16	0.33
O-acetylcholine	<i>Organic acids</i>	▲	**	2.31	15.01
Acetoacetate	<i>Carbohydrates</i>	▼	**	1.96	0.31
N-acetylserotonin	<i>Others</i>	▲	*	2.12	3.44
Riboflavin	<i>Others</i>	▼	*	1.93	0.13
Betaine	<i>Others</i>	▲	*	1.87	8.58
2-hydroxybutyrate	<i>Organic acids</i>	▲	*	1.58	4.34
Malonate	<i>Carboxylic acids</i>	▼	*	1.68	0.46
3,4-dihydroxybenzeneacetate	<i>Benzoic acids</i>	▲	*	1.50	3.92
2-hydroxy-3-methylvalerate	<i>Lipids</i>	▲	*	1.79	7.87
Succinate	<i>Carbohydrates</i>	▲	*	2.16	6.14
Lactulose	<i>Carbohydrates</i>	▼	*	1.71	0.22
Benzoate	<i>Organic acids</i>	▼	*	1.39	0.31
Methanol	<i>Alcohols</i>	↑	0.053	1.60	3.24
2-hydroxyphenylacetate	<i>Others</i>	↑	0.056	1.32	1.80
Acetylsalicylate	<i>Benzoic acids</i>	↓	0.056	1.90	0.19
3-phenyllactate	<i>Others</i>	↑	0.061	1.47	5.17
Glycolate	<i>Lipids</i>	↑	0.062	2.02	16.89
3-methylhistidine	<i>Amino acids</i>	↑	0.067	1.78	7.59
2-hydroxyisovalerate	<i>Lipids</i>	↑	0.071	2.09	34.48
Glucose-1-phosphate	<i>Carbohydrates</i>	↓	0.074	1.53	0.18
Acetate	<i>Organic acids</i>	↓	0.075	0.33	0.95
Azelate	<i>Lipids</i>	↑	0.088	1.66	2.46
Theophylline	<i>Others</i>	↓	0.095	1.35	0.98

<sup>1)</sup>Tendency : Comparison between OTP and HTP group, ▲/▼ : indicates relative increase/decrease significantly (p<0.05) HTP group, ↑/↓ : indicates relative increase/decrease tendency significantly (0.05≤p<0.1) HTP group. <sup>2)</sup>Significance determined at \*\*p<0.01, \*p<0.05. <sup>3)</sup>VIP : Variable importance in the projection obtained from PLS-DA model. <sup>4)</sup>FC : Fold change; Ratio of the mean intensity between OTP and HTP group replicates

Table 3. Differential enrichment of metabolites content of Holstein steers serum between optimum temperature period (OTP) and high temperature period (HTP) group (n=6)

Metabolites	Classification	Tendency <sup>1)</sup>	p value <sup>2)</sup>	VIP <sup>3)</sup>	FC <sup>4)</sup>
5-methoxysalicylate	<i>Benzoic acids</i>	▲	**	2.33	8.79
N-nitrosodimethylamine	<i>Organic acids</i>	▲	**	2.08	6.20
Methanol	<i>Alcohols</i>	▼	**	2.54	0.18
Tartrate	<i>Benzoic acids</i>	▲	*	1.87	4.77
sn-glycero-3-phosphocholine	<i>Lipids</i>	▼	*	1.83	0.39
Sarcosine	<i>Amines</i>	▲	*	2.32	16.62
Erythritol	<i>Carbohydrates</i>	▼	*	2.48	0.04
N-methylhydantoin	<i>Others</i>	▲	*	2.15	3.96
Glutathione	<i>Carbohydrates</i>	▲	*	1.71	4.46
Gallate	<i>Benzoic acids</i>	▲	*	1.50	3.64
Cellobiose	<i>Carbohydrates</i>	▼	*	1.55	0.26
Ethylene glycol	<i>Lipids</i>	▲	*	1.50	4.05
UDP-N <sup>2</sup> -acetylglucosamine	<i>Nucleosides, Nucleotides</i>	↑	0.054	1.41	3.45
N-phenylacetyl glycine	<i>Amino acids</i>	↑	0.057	1.53	5.64
Pyruvate	<i>Carbohydrates</i>	↑	0.058	2.07	2.87
O-acetylcholine	<i>Organic acids</i>	↓	0.059	1.76	0.30
Isocaproate	<i>Lipids</i>	↑	0.060	1.44	4.07
Glycylproline	<i>Carboxylic acids</i>	↓	0.061	1.63	0.38
Acetoacetate	<i>Carbohydrates</i>	↑	0.063	1.97	5.74
Lactate	<i>Organic acids</i>	↑	0.069	1.04	1.51
N-acetylaspartate	<i>Carboxylic acids</i>	↑	0.072	1.64	11.32
3-hydroxybutyrate	<i>Lipids</i>	↑	0.073	1.38	2.10
Succinate	<i>Carbohydrates</i>	↑	0.081	1.61	2.88
Isoeugenol	<i>Benzoic acids</i>	↑	0.082	1.57	2.45
Alanine	<i>Amino acids</i>	↑	0.082	0.76	1.29
Tyrosine	<i>Amino acids</i>	↓	0.094	1.39	0.64

<sup>1)</sup>Tendency : Comparison between OTP and HTP group, ▲/▼ : indicates relative increase/decrease significantly (p<0.05) HTP group, ↑/↓ : indicates relative increase/decrease tendency significantly (0.05≤p<0.1) HTP group. <sup>2)</sup>Significance determined at \*\*p<0.01, \*p<0.05. <sup>3)</sup>VIP : Variable importance in the projection obtained from PLS-DA model. <sup>4)</sup>FC : Fold change: Ratio of the mean intensity between OTP and HTP group replicates.

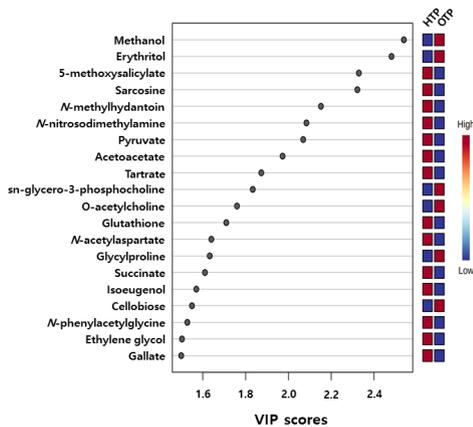


Fig. 6. Variable importance in projection (VIP) scores of serum metabolites in optimum temperature period (OTP) and high temperature period (HTP) by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy analysis (n=6). The selected metabolites were those with VIP score > 1.5. The heat map with red or blue squares on the right indicates high and low abundance ratio, respectively, of the corresponding serum metabolites in OTP and HTP groups. The VIP score was based on the partial least square-discriminant analysis model.

#### 4. 고찰

반추동물의 주요 에너지원인 VFA는 acetate, propionate, butyrate 등으로 약 70 : 20 : 10 %의 비율로 구성되어 있다. 또한 고온 환경에서는 사료 섭취량이 감소하고, 체온유지를 위한 에너지 소비가 증가한다 [28]. Tajima 등[29]과 Pragna 등[30]의 선행연구에 따르면 고온스트레스에 노출된 Holstein 착유우에서 총 VFA와 acetate 농도가 낮은 결과를 보였다고 하였다. 이번 연구의 반추위액 내 acetate의 농도는 HTP group에서 낮은 경향(p=0.075; VIP score : 0.33)을 보였으며, 수소는 암소에 비해 열 스트레스에 비교적 취약하지 않으므로[31] 이와 같은 결과를 보인 것으로 생각된다.

Riboflavin은 에너지, 탄수화물, 아미노산 및 지방대사와 관련된 전자전달 기능을 한다[32]. 반추위 내 riboflavin은 미생물에 의해 합성되며, 사료로 부터 분해되는 탄수화물과 단백질 수준이 높아짐에 따라 증가한다 [33,34]. 고온스트레스에 노출된 반추동물은 반추위 내 pH가 감소하고 이로 인해 cellulolytic bacteria 성장을

저해 시킨다[35]. 이번 연구의 riboflavin은 HTP group에서 유의적( $p < 0.05$ ; VIP score : 1.93)으로 낮은 결과를 보였다.

Succinate 생합성은 산화 tricarboxylic acid (TCA) cycle, reductive-branch TCA cycle 및 glyoxylate 대사경로에 관여하며 위 세 가지 대사경로는 ATP를 생성한다. Succinate는 glycerol의 당이 탄소원으로 작용할 때의 최종 생성물로 알려져 있다[36]. 고온스트레스에 노출된 반추동물은 체온유지를 위한 에너지를 소모하므로 고온기의 반추위액 내 succinate 농도가 높을 것으로 생각된다. 이번 연구의 succinate는 HTP group에서 유의적( $p < 0.05$ ; VIP score: 2.16)으로 높았으며, glycolate 또한 HTP group에서 높은 경향( $p = 0.062$ ; VIP score: 2.02)을 보였다.

반추동물의 메탄 발생은 사료섭취와 총 에너지 손실의 지표이며 메탄 발생이 증가함에 따라 지구온난화를 지속시키는 환경을 야기 시킨다[37,38]. 반추위 내 methanogen은 대부분 hydrogenotrophic 경로의 메탄 생성을 위해 수소와 이산화탄소를 이용한다[39,40]. 최근에는 methylotrophic methanogenic 경로의 메탄 생성을 위해 methyl기가 포함되어 있는 methylamine과 methanol을 이용한다고 하였다[41]. 이번 연구의 methanol은 HTP group에서 높은 경향( $p = 0.053$ ; VIP score : 1.60)을 보였다. 고온스트레스에 노출된 반추동물의 반추위액 내 대사체에 관한 연구는 국내 뿐 아니라 국외에서도 미비한 실정이다. 그러므로 이번 연구는 추후 반추위액 내 대사체를 이용한 고온스트레스 연구에 도움이 될 것으로 생각된다.

혈액 내 alanine, glutamate 및 histidine은 glucose 신생합성과 관련된 주요 전구체로 알려져 있다[42,43]. 반추동물의 사료섭취량이 감소하게 되면 alanine에 의해 glucose 신생합성과 glycolysis 과정을 거쳐 부족한 glucose를 보충한다[43,44]. Cao 등[45]에 의하면 고온스트레스의 환경에 노출되면 혈액 내 alanine 합성이 증가하고 이로 인해 alanine이 축적된다고 하였다. 이번 연구의 alanine은 HTP group에서 높은 경향( $p = 0.082$ ; VIP score : 0.76)을 보였다.

Ketosis는 혈액 내 BHBA의 농도에 따라 subclinical ketosis (1.2 ~ 1.4 mM/L)와 clinical ketosis (2.6 ~ 3.0 mM/L)로 구분 할 수 있으며[46,47], 혈액, 우유 및 뇨 내 ketone bodies (BHBA, acetoacetate 및 acetone) 대사체들을 이용하여 진단 할 수 있다[48]. 여름철 반추동물은 체중, 체온 및 착유에 필요한 에너지 요

구량에 비해 사료 섭취량이 감소하여 ketosis가 유발 될 수 있다[49]. 이번 연구의 BHBA ( $p = 0.073$ ; VIP score : 1.38)와 acetoacetate ( $p = 0.063$ ; VIP score : 1.97)는 HTP group에서 높은 경향을 보였다.

Pyruvate는 glucose 분해에 의해 생성되며 호기조건에서는 TCA cycle를 통해 에너지 공급을 위한 acetyl-CoA로 전환 될 수 있다[50]. 혐기조건에서의 pyruvate는 lactate dehydrogenase에 의해 lactate로 환원되고 이는 에너지 공급을 위한 glycolysis 억제제를 방지하는 역할을 하며 glucose의 최종산물이다[51]. 이번 연구의 pyruvate ( $p = 0.058$ ; VIP score : 2.07)와 lactate ( $p = 0.069$ ; VIP score : 1.04)는 HTP group에서 높은 경향을 보였다.

Residual feed intake (RFI)는 사료 효율을 측정할 수 있는 값으로 어느 특정 기간의 체중(유지) 및 성장률을 바탕으로 개체의 기대 섭취량과 실제 섭취량간의 차이를 말한다. 이는 반추동물의 체중과 일당증체량과는 무관하나[52] 낮은 RFI는 높은 RFI에 비해 일당증체량 대비 사료섭취량이 적고[53], 메탄 생성량은 약 25 ~ 28 % 더 낮은 것으로 알려져 있다[54]. Foroutan 등[53]의 연구에서는 높은 RFI group의 혈액 내 succinate와 tyrosine의 농도가 높은 결과를 보였다. 이번 연구의 succinate ( $p = 0.081$ ; VIP score : 1.61)는 HTP group에서 높은 경향을 보였다. 고온스트레스와 RFI는 직접적인 관련은 없지만 공통적으로 사료 섭취량과 메탄 발생에 관련이 있다. 그러므로 이와 같은 대사체들은 반추동물의 고온스트레스를 진단 할 수 있는 혈액 내 대사체 bio-marker 후보군이 될 수 있을 것으로 생각된다.

## 5. 결론

이번 연구는 온·습도 환경변화에 따른 Holstein 수소의 반추위액과 혈청 내 대사체 비교 연구를 실시하였다. 반추위액에서는 총 27개의 대사체들이 유의적 또는 유의적 경향을 보였고, 그 중 acetate와 riboflavin은 OTP group에서 높았으며, succinate와 methanol은 HTP group에서 높았다. 혈청에서는 총 26개의 대사체들이 유의적 또는 유의적 경향을 보였고, 그 중 acetoacetate, alanine, BHBA, lactate, pyruvate 및 succinate는 HTP group에서 높았다.

고온스트레스에 관한 국외 선행연구는 대부분 Holstein 착유우이며, 이번 연구와 비교하였을 때 변화

하는 대사체들의 종류는 대부분 일치하였지만 두 group 간 비교의 유의적 차이는 일부 일치하였다. 그러나 국내의 고온스트레스 대사체 연구는 기초단계이므로 본 논문이 선행 연구 자료로 활용 될 수 있을 것으로 생각된다. 또한 프로파일링 된 대사체와 고온스트레스와의 상관관계 구명 연구가 진행된다면 축산업계의 여름철 생산성 저하를 최소화 하는데 도움이 될 것으로 생각된다.

## References

- [1] H. Hammami, J. Bormann, N. M'hamdi, H. H. Montaldo, N. Gengler, "Evaluation of heat stress effects on production traits and somatic cell score of Holsteins in a temperate environment", *Journal of Dairy Science*, Vol.96, No.3, pp.1844-1855, March 2013. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5947>
- [2] A. Sammad, Y. J. Wang, S. Umer, H. Lirong, I. Khan, A. Khan, B. Ahmad, Y. Wang, "Nutritional physiology and biochemistry of dairy cattle under the influence of heat stress: Consequences and opportunities", *Animals*, Vol.10, pp.793, May 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani10050793>
- [3] N. R. St-Pierre, B. Cobanov, G. Schnitkey, "Economic losses from heat stress by US livestock industries", *Journal of Dairy Science*, Vol.86, pp.E52-E57, June 2003. DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)74040-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)74040-5)
- [4] F. R. Dunshea, B. J. Leury, F. Fahri, K. DiGiacomo, A. Hung, S. Chauhan, I. J. Clarke, R. Collier, S. Little, L. Baumgard, "Amelioration of thermal stress impacts in dairy cows", *Animal Production Science*, Vol.53, No.9, pp.965-975, July 2013. DOI: <https://doi.org/10.1071/AN12384>
- [5] C. H. Johnson, J. Ivanisevic, G. Siuzdak, "Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol.17, No.7, pp.451-459, March 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.25>
- [6] C. Xu, L. Sun, C. Xia, H. Zhang, J. Zhang, J. Wang, "1H-nuclear magnetic resonance-based plasma metabolic profiling of dairy cows with fatty liver", *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, Vol.29, No.2, pp.219-229, Feb. 2016. DOI: <https://doi.org/10.5713/ajas.15.0439>
- [7] A. P. Tikunov, C. B. Johnson, H. Lee, M. K. Stoskopf, J. M. Macdonald, "Metabolomic investigations of American oysters using 1H-NMR spectroscopy", *Marine drugs*, Vol.8, No.10, pp.2578-2596, Oct. 2010. DOI: <https://doi.org/10.3390/md8102578>
- [8] C. Zhu, C. Li, Y. Wang, L. Laghi, "Characterization of yak common biofluids metabolome by means of proton nuclear magnetic resonance spectroscopy", *Metabolites*, Vol.9, No.3, pp.41, March 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/metabo9030041>
- [9] D. S. Wishart, "Metabolomics: applications to food science and nutrition research", *Trends in Food Science & Technology*, Vol.19, No.9, pp.482-493, Sep. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.03.003>
- [10] M. Islam, S. H. Kim, A. Son, S. C. Ramos, C. D. Jeong, Z. Yu, S. H. Kang, Y. Cho, S. Lee, K. Cho, S. Lee, "Seasonal influence on rumen microbiota, rumen fermentation, and enteric methane emissions of Holstein and Jersey steers under the same total mixed ration", *Animals*, Vol.11, No.4, pp.1184, April 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani11041184>
- [11] J. Guo, S. Gao, S. Quan, Y. Zhang, D. Bu, J. Wang, "Blood amino acids profile responding to heat stress in dairy cows", *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, Vol.31, No.1, pp.47-53, Jan 2018. DOI: <https://doi.org/10.5713/ajas.16.0428>
- [12] Y. Liao, R. Hu, Z. Wang, Q. Peng, X. Dong, X. Zhang, H. Zou, Q. Pu, B. Xue, L. Wang, "Metabolomics profiling of serum and urine in three beef cattle breeds revealed different levels of tolerance to heat stress", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol.66, No.26, pp.6926-6935, June 2018. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01794>
- [13] J. S. Eom, S. J. Lee, H. S. Kim, Y. Y. Choi, S. H. Kim, Y. G. Lee, S. S. Lee, "Metabolomics comparison of Hanwoo (*Bos taurus coreanae*) biofluids using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy", *Metabolites*, Vol.10, No.8, pp.333, Aug. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/metabo10080333>
- [14] H. S. Kim, E. T. Kim, J. S. Eom, Y. Y. Choi, S. J. Lee, S. S. Lee, C. D. Chung, S. S. Lee, "Exploration of metabolite profiles in the biofluids of dairy cows by proton nuclear magnetic resonance analysis", *PLOS ONE*, Vol.16, No.1, pp.e0246290, Jan. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246290>
- [15] J. S. Eom, E. T. Kim, H. S. Kim, Y. Y. Choi, S. J. Lee, S. S. Lee, S. H. Kim, S. S. Lee, "Metabolomics comparison of rumen fluid and milk in dairy cattle using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy", *Animal Bioscience*, Vol.34, No.2, pp.213-222, Feb. 2021. DOI: <https://doi.org/10.5713/ajas.20.0197>
- [16] J. S. Eom, H. S. Kim, S. J. Lee, Y. Y. Choi, S. U. Jo, J. Kim, S. S. Lee, E. T. Kim, S. S. Lee, "Metabolic profiling of rumen fluid and milk in lactating dairy cattle influenced by subclinical ketosis using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy", *Animals*, Vol.11, No.9, pp.2526, Aug. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani11092526>
- [17] D. H. Kim, M. H. Kim, S. B. Kim, S. M. Ha, J. K. Son, J. H. Lee, T. Y. Hur, J. Y. Lee, J. H. Park, H. C. Choi, H. J. Lee, B. Y. Park, K. S. Ki, E. T. Kim, "Effects of heat-stress on rumen bacterial diversity and composition of Holstein cows", *Journal of The Korean Society of Grassland Science*, Vol.39, No.4, pp.227-234, Dec. 2019.

- DOI: <https://doi.org/10.5333/KGFS.2019.39.4.227>
- [18] D. H. Kim, M. H. Kim, S. B. Kim, J. K. Son, J. H. Lee, S. S. Joo, B. H. Kim, T. Park, B. Y. Park, E. T. Kim, "Differential dynamics of the ruminal microbiome of Jersey cows in a heat stress environment", *Animals*, Vol.10, No.7, pp.1127, July 2020.  
DOI: <https://doi.org/10.3390/ani10071127>
- [19] J. H. Park, H. C. Choi, H. J. Lee, E. T. Kim, J. K. Son, D. H. Kim, "A study on the effect of temperature-humidity index on the respiration rate, rectal temperature and rumination time of lactating Holstein cow in summer season", *Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society*, Vol.20, No.11, pp.136-143, Nov. 2019.  
DOI: <https://doi.org/10.5762/KAIS.2019.20.11.136>
- [20] W. S. Kim, J. Lee, S. W. Jeon, D. Q. Peng, Y. S. Kim, M. H. Bae, Y. H. Jo, H. G. Lee, "Correlation between blood, physiological and behavioral parameters in beef calves under heat stress", *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, Vol.31, No.6, pp.919-925, June 2018.  
DOI: <https://doi.org/10.5713/ajas.17.0545>
- [21] AOAC, "Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists", AOAC International: Gaithersburg, MD, USA. 2003.
- [22] AOAC, "Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists", AOAC International: Gaithersburg, MD, USA. 2005.
- [23] P. J. Van Soest, J. B. Robertson, B. A. Lewis, "Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition", *Journal of Dairy Science*, Vol.74, No.10, pp.3583-3597, Oct. 1991.  
DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
- [24] C. B. Tucker, A. R. Rogers, K. E. Schütz, "Effect of solar radiation on dairy cattle behaviour, use of shade and body temperature in a pasture-based system", *Applied Animal Behaviour Science*, Vol.109, No.2-4, pp.141-154, Feb. 2008.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2007.03.015>
- [25] T. F. O'Callaghan, R. Vazquez-Fersno, A. Serra-Cayuela, E. Dong, R. Mandal, D. Hennessy, S. McAuliffe, P. Dillon, D. S. Wishart, C. Stanton, R. P. Ross, "Pasture feeding changes the bovine rumen and milk metabolome", *Metabolites*, Vol.8, No.2, pp.27, April 2018.  
DOI: <https://doi.org/10.3390/metabo8020027>
- [26] Y. Sun, C. Xu, C. Li, C. Xia, C. Xu, L. Wu, H. Zhang, "Characterization of the serum metabolic profile of dairy cows with milk fever using <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy", *Veterinary Quarterly*, Vol.34, No.3, pp.159-163, 2014.  
DOI: <https://doi.org/10.1080/01652176.2014.924642>
- [27] M. S. Kim, I. Y. Kim, H. R. Sung, M. Nam, Y. J. Kim, D. S. Kyung, J. K. Seong, G. S. Hwang, "Metabolic dysfunction following weight regain compared to initial weight gain in a high-fat diet-induced obese mouse model", *The Journal of Nutritional Biochemistry*, Vol.69, pp.44-52, July 2019.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.02.011>
- [28] J. Liu, L. Li, X. Chen, Y. Lu, D. Wang, "Effects of heat stress on body temperature, milk production, and reproduction in dairy cows: a novel idea for monitoring and evaluation of heat stress - A review", *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, Vol.32, No.9, pp.1332-1339, Sep. 2019.  
DOI: <https://doi.org/10.5713/ajas.18.0743>
- [29] K. Tajima, I. Nonaka, K. Higuchi, N. Takusari, M. Kurihara, A. Takenaka, M. Mitsumori, H. Kajikawa, R. I. Aminov, "Influence of high temperature and humidity on rumen bacterial diversity in Holstein heifers", *Anaerobe*, Vol.13, No.2, pp.57-64, April 2007.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2006.12.001>
- [30] P. Pragna, S. S. Chauhan, V. Sejian, B. J. Leury, F. R. Dunshea, "Climate change and goat production: Enteric methane emission and its mitigation", *Animals*, Vol.8, No.12, pp.235, Dec. 2018.  
DOI: <https://doi.org/10.3390/ani8120235>
- [31] C. T. Kadzere, M. R. Murphy, N. Silanikove, E. Maltz, "Heat stress in lactating dairy cows: a review", *Live Production Science*, Vol.77, No.1, pp.59-91, Oct. 2002.  
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(01\)00330-x](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(01)00330-x)
- [32] S. Balasubramaniam, J. Y. Lee, "Riboflavin metabolism: role in mitochondrial function", *Journal of Translational Genetics and Genomics*, Vol.4, pp.285-306, Aug. 2020.  
DOI: <http://doi.org/10.20517/jtgg.2020.34>
- [33] V. Beaudet, R. Gervais, B. Graulet, P. Nozière, M. Doreau, A. Fanchone, D. D. S. Castagnino, C. L. Girard, "Effects of dietary nitrogen levels and carbohydrate sources on apparent ruminal synthesis of some B vitamins in dairy cows", *Journal of Dairy Science*, Vol.99, No.4, pp.2730-2739, April 2016.  
DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10521>
- [34] D. S. Castagnino, M. Seck, R. A. Longuski, Y. Ying, M. S. Allen, R. Gervais, P. Y. Chouinard, C. L. Girard, "Particle size and endosperm type of dry corn grain altered duodenal flow of B vitamins in lactating dairy cows", *Journal of Dairy Science*, Vol.101, No.11, pp.9841-9846, Nov. 2018.  
DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15131>
- [35] J. B. Russell, J. L. Rychlik, "Factors that alter rumen microbial ecology", *Science*, Vol.292, No.5519, pp.1119-1122, May 2001.  
DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1058830>
- [36] K. K. Cheng, G. Y. Wang, J. Zeng, J. A. Zhang, "Improved succinate production by metabolic engineering", *BioMed Research International*, Vol.2013, pp.1-12, April 2013.  
DOI: <https://doi.org/10.1155/2013/538790>
- [37] K. A. Johnson, D. E. Johnson, "Methane emissions from cattle", *Journal of Animal Science*, Vol.73, No.8,

- pp.2483-2492, Aug. 1995.  
DOI: <https://doi.org/10.2527/1995.7382483x>
- [38] J. A. D. R. N. Appuhanmy, J. France, E. Kebreab, "Models for predicting enteric methane emissions from dairy cows in North America, Europe, and Australia and New Zealand", *Global Change Biology*, Vol.22, No.9, pp.3039-3056, May 2016.  
DOI: <https://doi.org/10.1111/gcb.13339>
- [39] D. P. Morgavi, E. Forano, C. Martin, C. J. Newbold, "Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants", *Animal*, Vol.4, No.7, pp.1024-1036, April 2010.  
DOI: <https://doi.org/10.1017/S1751731110000546>
- [40] J. Palarea-Albaladejo, J. A. Rooke, I. M. Nevison, R. J. Dewhurst, "Compositional mixed modeling of methane emissions and ruminal volatile fatty acids from individual cattle and multiple experiments", *Journal of Animal Science*, Vol.95, No.6, pp.2467-2480, June 2017.  
DOI: <https://doi.org/10.2527/jas.2016.1339>
- [41] M. Poulsen, C. Schwab, B. B. Jensen, R. M. Engberg, A. Spang, N. Canibe, O. Højberg, G. Milinovich, L. Fragner, C. Schleper, W. Weckwerth, P. Lund, A. Schramm, T. Urich, "Methylophilic methanogenic Thermoplasmata implicated in reduced methane emissions from bovine rumen", *Nature Communications*, Vol.4, pp.1428, Feb. 2013.  
DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms2432>
- [42] F. C. Cowley, D. G. Barber, A. V. Houlihan, D. P. Poppi, "Immediate and residual effects of heat stress and restricted intake on milk protein and casein composition and energy metabolism", *Journal of Dairy Science*, Vol.98, No.4, pp.2356-2368, April 2015.  
DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8442>
- [43] S. Yue, S. Ding, J. Zhou, C. Yang, X. Hu, X. Zhao, Z. Wang, L. Wang, Q. Peng, B. Xue, "Metabolomics approach explore diagnostic biomarkers and metabolic changes in heat-stressed dairy cows", *Animals*, Vol.10, No.10, pp.1741, Sep. 2020.  
DOI: <https://doi.org/10.3390/ani10101741>
- [44] A. J. Meijer, "Amino acids as regulators and components of nonproteinogenic pathways", *The Journal of Nutrition*, Vol.133, No.6, pp.2057S-2062S, June 2003.  
DOI: <https://doi.org/10.1093/in/133.6.2057S>
- [45] Y. Ai, Y. Cao, Z. L. Xie, Y. S. Zhang, X. Z. Shen, "Relationship between free amino Acids in cow's blood and decreasing milk protein under heat stress (In Chinese)", *Food Science*, Vol.36, pp.38-41, 2015.  
DOI: <https://doi.org/10.7506/spkx1002-6630-201511008>
- [46] G. Zhang, B. N. Ametaj, "Ketosis an old story under a new approach", *Dairy*, Vol.1, No.1, pp.42-60, May 2020.  
DOI: <https://doi.org/10.3390/dairy1010005>
- [47] V. S. Suthar, J. Canelas-Raposo, A. Deniz, W. Heuwieser, "Prevalence of subclinical ketosis and relationships with postpartum diseases in European dairy cows", *Journal of Dairy Science*, Vol.96, No.5, pp. 2925-2938, May 2013.  
DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6035>
- [48] T. Duffield, "Subclinical ketosis in lactating dairy cattle", *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, Vol.16, No.2, pp. 231-253, July 2000.  
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30103-1](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30103-1)
- [49] V. Gantner, K. Kuterovac, K. Potočnik, "Effect of heat stress on metabolic disorders prevalence risk and milk production in Holstein cows in Croatia", *Annals of Animal Science*, Vol.16, No.2, pp.451-461, Feb. 2016.  
DOI: <https://doi.org/10.1515/aoas-2015-0097>
- [50] G. Birungi, S. M. Chen, B. P. Loy, M. L. Ng, S. F. Li, "Metabolomics approach for investigation of effects of dengue virus infection using the EA.hy926 cell line", *Journal of Proteome Research*, Vol.9, No.12, pp.6523-6534, Oct. 2010.  
DOI: <https://doi.org/10.1021/pr100727m>
- [51] J. Xuan, G. Pan, Y. Qiu, L. Yang, M. Su, Y. Liu, J. Chen, G. Feng, Y. Fang, W. Jia, Q. Xing, L. He, "Metabolomic profiling to identify potential serum biomarkers for schizophrenia and risperidone action", *Journal of Proteome Research*, Vol.10, No.12, pp.5433-5443, Oct. 2011.  
DOI: <https://doi.org/10.1021/pr2006796>
- [52] J. A. Basarab, M. A. Price, J. L. Aalhus, E. K. Okine, W. M. Snelling, K. L. Lyle, "Residual feed intake and body composition in young growing cattle", *Canadian Journal of Animal Science*, Vol.83, No.2, pp.189-204, June 2003.  
DOI: <https://doi.org/10.4141/A02-065>
- [53] A. Foroutan, C. Fitzsimmons, R. Mandal, M. V. Berjanskii, D. S. Wishart, "Serum metabolite biomarkers for predicting residual feed intake (RFI) of young angus bulls", *Metabolites*, Vol.10, No.12, pp.491, Nov. 2020.  
DOI: <https://doi.org/10.3390/metabo10120491>
- [54] J. A. Basarab, K. A. Beauchemin, V. S. Baron, K. H. Ominski, L. L. Guan, S. P. Miller, J. J. Crowley, "Reducing GHG emissions through genetic improvement for feed efficiency: Effects on economically important traits and enteric methane production", *Animal*, Vol.7, No.2, pp.303-315, June 2013.  
DOI: <https://doi.org/10.1017/S1751731113000888>

엄 준 식(Jun-Sik Eom)

[정회원]



- 2017년 8월 : 경상대학교 응용생명과학부 (이학석사)
- 2021년 8월 : 경상국립대학교 응용생명과학부 (이학박사)
- 2021년 9월 ~ 현재 : 경상국립대학교 농업생명과학연구원 선임연구원

<관심분야>

반추동물영양, 반추동물미생물, 반추동물대사

서 성 원(Seong-Won Seo)

[정회원]



- 2006년 8월 : 코넬대학교 대학원 축산학과 (이학박사)
- 2008년 9월 ~ 현재 : 충남대학교 동물자원과학부 교수
- 2012년 4월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 한국가축사양표준위원회 위원
- 2020년 3월 ~ 현재 : 미국 Texas A&M 대학교 축산학과 겸임교수

<관심분야>

반추동물영양, 정밀사양, 스마트팜

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 : 경상국립대학교 농업생명과학연구원 학술연구교수

<관심분야>

반추동물영양, 반추동물미생물, 반추동물대사

박 성 민(Seong-Min Park)

[정회원]



- 2012년 2월 : 전남대학교 동물자원과학과 (학사)
- 2016년 8월 : 충남대학교 대학원 낙농자원학과 (석사)
- 2021년 9월 : 충남대학교 대학원 낙농자원학과 (박사수료)
- 2011년 10월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 낙농과 농업연구사

<관심분야>

반추동물영양, 반추동물대사, 스마트팜

이 상 석(Sang-Suk Lee)

[정회원]



- 2002년 2월 : 중앙대학교 동물생명공학과 (농학박사)
- 2006년 2월 ~ 현재 : 순천대학교 동물자원과학과 교수
- 2012년 4월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 한국가축사양표준위원회 위원
- 2019년 1월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 사료공정심의위원장

<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 : 농촌진흥청 국립축산과학원 영양생리과 연구사
- 2002년 3월 ~ 현재 : 경상국립대학교 축산생명학과 교수
- 2015년 7월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 한국가축사양표준 젖소분과위원장

<관심분야>

반추동물영양, 반추동물미생물, 반추동물대사