

코발트 첨가 급여가 착유우의 고온기 반추위 발효성상과 미생물 군집에 미치는 영향

박지후, 엄준식, 임동현, 박성민, 김동현
국립축산과학원 낙농과
e-mail:jihoo@korea.kr

Effects of Cobalt Supplementation on Rumen Fermentation Characteristics and Microbial Communities in Lactating Dairy Cows During Heat Stress

Jihoo Park, Junsik Eom, Donghyun Lim, Seongmin Park, Donghyeon Kim
National Institute of Animal Science

요약

본 연구에서는 열 스트레스 조건에서 코발트 첨가 급여가 홀스타인 젖소의 반추위 발효 특성과 미생물 군집 변화에 미치는 영향을 평가하였다. 10두의 홀스타인 착유우를 대상으로 대조구는 NRC 권장 코발트 요구량(0.1 mg/kg)을, 처리구는 0.8 mg/kg를 각 2주 간 적온기(THI 67.17 ± 5.46)와 고온 스트레스 기간(THI 79.09 ± 3.85) 동안 급여하였다. 연구 결과, 고온기에 코발트를 보충 급여한 그룹의 반추위에서 총 휘발성 지방산(VFA) 농도가 대조군에 비해 유의하게 높았으며 ($p < 0.05$), 아세트산이 유의하게 증가($p < 0.05$)하고 프로피온산이 증가하는 경향을 보였다. 또한 처리구의 암모니아 질소(NH₃-N) 농도가 유의하게 증가하였다($p < 0.05$). 미생물 군집 분석에서는 주요 섬유 분해 세균인 Ruminococcus sp. JE7A12의 풍부도가 처리구에서 유의하게 증가하였고($p < 0.05$), Acetivibrio의 수준도 더 높게 나타났다($p < 0.05$). 이러한 결과는 코발트 보충이 반추위 발효와 미생물 군집에 긍정적인 영향을 미쳐 젖소의 열 스트레스를 완화하는 데 기여할 수 있음을 시사한다.

1. 서론

고온스트레스 환경은 온·습도 지수 (THI)가 평균 약 72 이상을 말하며 [1], 이는 반추동물의 사료섭취량 감소, 직장 온도 증가뿐 아니라 [2] 특히 착유우의 우유 생산량과 성분, 번식능력 감퇴 및 대사성 질병 (ketosis, mastitis 등)을 유발시켜 낙농업의 경제적 손실을 초래할 수 있다 [3].

첨가제, 미네랄, 무기질 등 첨가 급여를 통해 고온스트레스를 완화 시키는 연구는 국외에서 활발히 수행되고 있다 [4]. 국내에서도 관련 연구가 진행되고 있으나 [5] 상대적으로 미비한 실정이므로 국내 착유우의 고온스트레스 완화 관련 첨가제 연구가 필요하다.

미량 무기물 중 코발트는 vitamin B12 (cobalamin)의 구성요소로, 반추동물에 있어 반추위 내 propionate 대사와 methionine 합성뿐 아니라 [6] gluconeogenesis와 지방산화에 중요한 역할을 하고 [7] 반추위 미생물들의 B12 합성에 이용되며, 착유우에게 있어 코발트 필수 요구량은 0.11mg/kg으로 알려져 있다 [8]. 선행연구에 따르면, 요구량 이상의 코발트와 저질 조사료를 급여 시 반추위 내 섬유소 분해를 촉진시키며 [9], 육성우의 성장에 도움을 줄 수 있다 [10]. 또한 Casper 등 (2021)에 따르면 섬유질배합사료 (total mixed ration, TMR)

과 코발트와 조사료 함량이 높은 TMR의 급여 비교 결과, 유량과 성분, 사료 섭취량 및 체중에는 차이가 없었고, 반추위 내 acetate 함량이 증가한다고 하였으며 [11], Akin 등 (2013)은 착유우의 유량에는 영향을 미치지 않으면서 우유 내 vitamin B12 함량이 증가한다고 하였다 [12].

이는 코발트 첨가 급여가 반추동물의 사료 섭취 효율을 증가시킬 수 있다는 가능성을 시사하며, 따라서 사료 섭취량이 감소하는 고온스트레스를 완화할 수 있는 무기물로 활용될 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 코발트 급여 연구는 반추동물의 소화대사와 생산성 관련 등이 대부분이며, Park 등 (2023)의 연구에 따르면, 고온기의 착유우에게 코발트 첨가 급여는 호흡수 혈액 성분 및 유성분에 차이를 보이지 않았으며, 반추위 내 체온과 직장 온도의 감소 효과를 보였다고 하였으나 [13] 반추위 내 발효와 미생물 군집 관련 연구는 매우 미비한 실정이다.

이번 연구에서는 필수 급여량 이상의 코발트 첨가에 따른 적온기와 고온기의 홀스타인 착유우의 반추위 내 pH, 휘발성 지방산 및 암모니아태 분석을 통한 발효성상과 사료 소화에 직접 영향을 미치는 미생물 군집을 비교 분석하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 공시동물 및 시험사료

본 연구에서는 홀스타인종 착유우 10두 (85 ± 20 개월령, 체중 727.2 ± 79.0 kg)를 공시하여 실시하였다. 급여 사료는 한국가축사양표준 (KFSD, 2017)의 영양소 요구량에 따라 국립축산과학원 낙농과에서 제조된 TMR을 이용하였으며 공시동물에 급여한 사료의 화학성분 분석을 위하여 TMR 시료는 65°C 송풍 건조기에서 48시간 건조시킨 후 입자도가 1 mm가 되도록 분쇄하여 분석용 시료로 이용하였다. 조단백질 (crude protein, CP)과 조지방 (ether extract, EE)은 AOAC (1990) [14] 방법에 따라 Kjeldahl와 Soxhlet를 분석법을 이용하였으며, Neutral Detergent Fiber (NDF)와 Acid Detergent Fiber (ADF) 함량은 Ankom 200 fiber analyzer를 이용하여 Van Soest 등(1991) [15]의 방법에 따라 분석하였다.

2.2 실험설계

본 연구에서는 사료 내 코발트 첨가가 젓소의 생리특성에 미치는 영향을 구명하기 위하여 2022년 5월(THI: 67.17 ± 5.46)과 7월(THI: 79.09 ± 3.85)에 각각 2주에 걸쳐 코발트의 급여 수준을 달리하여 시험을 수행하였다. 사료에 첨가한 코발트는 선행 연구 결과 [16]에 따라 글루코헵톤산 코발트 (Co-glucoheptonate)를 활용하였고 정량의 코발트 급여를 위하여 매일 1회 오전 9시에 주사기를 이용해 경구투여 하였고, 대조구는 0.1 mg/kg(NRC 기준 코발트 권장량), 처리구는 0.8 mg/kg를 급여하였다.

2.3 조사항목

2.3.1 pH

반추위 내 pH와 온도 측정을 위하여 젓소의 입을 통해 센서 (㈜한국IoT, Korea)를 반추위 내에 삽입하여 데이터를 취득하였다. 데이터 수집 단위는 10분 단위로 취득하고 분석에 사용된 데이터는 적온기(THI < 72)인 5월 17일 ~ 5월 31일과 고온기(THI ≥ 72)인 7월 28일 ~ 8월 11일까지 총 39,338개의 데이터를 활용하였다.

2.3.2 암모니아태 질소

반추위액은 Shen 등 (2012) [17]의 방법에 따라 stomach tube를 이용하여 적온기와 고온기 시험 종료 직전 채취하였으며, 반추위액 내 암모니아태 질소 (NH₃-N) 생성량은 Chaney와 Marbach (1962) [18]의 방법에 따라 분석하였다. 4000 rpm으로 15분간 원심분리하고, 상등액 10 μ L을 tube에 옮긴 후 phenol color reagent 0.5 mL와 alkali-hypochlorite reagent 0.5 mL를 동시에 혼합하는 전처리 과정 수행하였다. 전처리한 시료를 50°C의 heating block에서 7분간 반응시킨 후 분광광도계 (Optizen UV2120, Mecasis, Korea)를 이용하여 630 nm에서 흡광도 (OD; Optical density) 값을 측정하였다.

2.3.3 휘발성지방산

휘발성지방산 (VFA; Volatile fatty acid) 분석은 Erwin 등 (1961) [19]의 방법에 따라 수행하였다. 반추위액을 4,000 rpm으로 원심 분리한 상등액 1 mL에 metaphosphoric acid 200 μ L를 첨가한 후 실온에서 30분 동안 정치시켰다. 그후 13,000 rpm에서 재 원심 분리한 후, syringe filter를 이용해 미세입자를 완전히 제거하였으며, NukolTM, fused silica capillary column (0.25 mm I.d. \times 0.25 μ m film \times 30 m length, SUPELCO, USA)이 장착된 gas chromatography (HP7890, Agilent, CA, USA)로 분석하였다. Gas chromatography의 oven, injector 및 detector 온도는 각각 180°C, 220°C 및 200°C로 설정하였다.

2.3.4 미생물 군집 변화

미생물 군집 분석은 차세대 염기 서열 분석법인 NGS를 이용하였으며, The bioinformatix (Gyeonggi-do, Gwangmyeong-si, Korea)에 의뢰하여 분석하였다. 반추위액의 라이브리리 구성을 위해 제조사의 프로토콜에 따라 QIASymphony® PowerFecal® Pro DNA Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 DNA를 추출하였고, 각각의 sequencing 된 시료는 Illumina 16S metagenomic sequencing library 프로토콜에 따라 준비하였다. 최종 PCR 산물은 차세대염기서열 분석인 Illumina Miseq™ platform (San Diego, CA, USA)를 사용하여 제조사의 메뉴얼에 따라 The bioinformatix (Gyeonggi-do, Gwangmyeong-si, Korea)에서 수행하였다. 염기 서열 분석이 완료된 후 품질 평가를 위해 FastQC (FastQC; ver. 0.11.8)를 통해 Q score가 20 이상인 부분을 사용하였으며, 분석의 정확성 향상을 위해 KneadData (KneadData; The Huttenhower Lab)를 이용하여 host 서열 및 adapter 서열을 제거한 후 데이터 분석을 수행하였다. 이렇게 얻어진 DNA 판독 값을 centrifuge 방법과 NCBI 데이터베이스를 이용하여 각 시료의 DNA 판독 값들을 분류하였다. 이를 바탕으로 QIIME2 (Quatitative Insights into Microbial Ecology, version 2021.11)을 이용하여 미생물 군집 분석을 실시하였다.

2.4.5 통계분석

본 연구에서 산출된 데이터는 SPSS (IBM Corp. Released 2020. Version 27.0. Armonk, NY: IBM Corp)로 분석을 수행하였다. 미생물 군집 데이터를 제외한 모든 데이터의 분석은 반복측정 MIXED 모델을 이용하여 이루어졌으며, 분석모델은 처리구의 고정효과, 시간효과, 처리구와 시간효과를 포함하였다. 결과에 대한 유의성 검정은 $p < 0.05$ 수준으로 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 반추위 발효 특성 변화

적온기와 고온기의 코발트 첨가 급여에 따른 홀스타인 착유우의 반추위 pH, VFA 및 NH₃-N 결과는 Table 1과 같다. 고온 스트레스 환경의 반추동물은 사료 섭취 불균형에 따라 반추위 내 lactate 농도가 증가하여 pH가 감소할 수 있으며, 지속될 경우 대사성 질병인 acidosis가 발병할 수 있다. Hall (2009) [20]에 따르면, 반추위 온도 상승으로 인한 pH의 범위는 평균 5.73 ~ 5.82로서 착유우의 경우 5.82 ~ 6.03의 범위를 보였다고 하였다. 이번 연구의 반추위 pH는 6.15 ~ 6.60의 범위를 보였으며, 그중 고온기의 대조구와 코발트 첨가구간 유의적인 차이를 보이지 않았다.

착유우에게 VFA 농도는 생산성과 직접적인 관련이 있으므로 중요하다. 고온 스트레스 환경의 반추동물은 반추위와 되새김 활동이 감소 되어 섭취한 사료의 소화에 영향을 미칠 수 있으며 이로 인해 에너지 대사에 부정적인 영향을 미쳐 주된 에너지원인 총 VFA 농도가 감소하게 된다. 이번 연구의 총 VFA와 acetate 농도는 적온기와 고온기의 코발트 첨가구에서 대조구에 비해 유의하게 높았으며($p < 0.05$), propionate와 butyrate 농도는 각각 고온기의 처리구에서 대조구에 비해 높았다 ($p < 0.05$).

Table 1. Effects of heat stress and cobalt administration on fermentation characteristics in lactating Holstein cows.

Items ¹⁾	Period ²⁾				SE M ³⁾	p value ⁴⁾		
	OTP		HTP			Trt	Per	Int
	CO N	Trt	CO N	Trt				
pH	6.60	6.41	6.23	6.15	0.36	0.24	0.01	0.65
C2 (mM)	55.9	60.9	54.5	61.8	8.84	0.04	0.82	0.91
C3 (mM)	20.7	20.9	17.4	22.1	4.87	0.09	0.75	0.19
iso-C4 (mM)	0.87	1.10	0.59	0.82	0.29	0.055	0.002	0.86
C4 (mM)	15.0	16.3	9.97	14.1	3.45	0.04	<0.001	0.12
Total VFA	95.7	102.7	83.8	101	15.4	0.03	0.01	0.61
NH ₃ -N (mg/dL)	11.5	13.4	7.19	9.30	3.45	0.02	<0.001	0.80

¹⁾C2: acetate; C3: propionate; iso-C4: iso-butyrate; C4: butyrate; VFA: volatile fatty acid; NH₃-N: ammonia nitrogen.

²⁾OTP: optimum temperature period; HTP: high temperature period; CON: control; Trt: treatment

³⁾SEM : Standard error of the mean

⁴⁾Trt: treatment; Per: period; Int: interaction

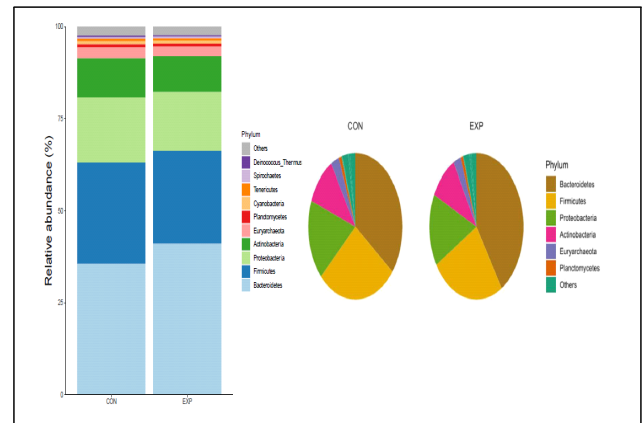
위 연구결과 고온 스트레스에 노출된 착유우의 코발트 첨가 급여는 반추위 pH에는 부정적인 영향을 주지 않으며 VFA 농도를 증가시키는 결과를 보였으며 이는 코발트 첨가 급여는 착유우의 고온 스트레스를 완화 시킬 수 있다는 가능성을 시사하였다.

3.2. 미생물 군집 변화

반추위 미생물은 반추동물의 대사에서 중요한 역할을 하며,

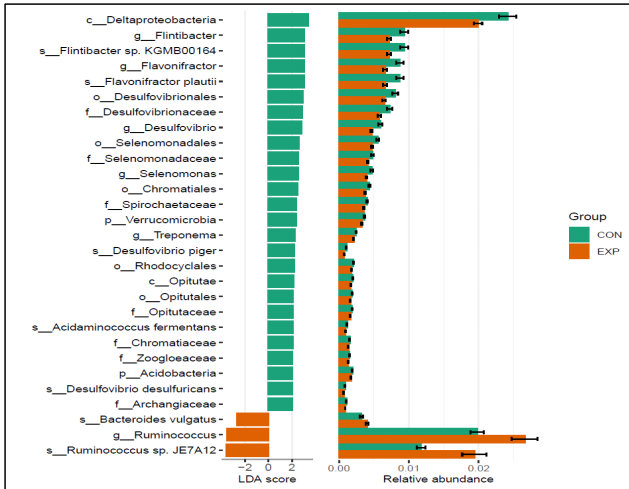
균총 조성과 함량 비율 변화로 반추위 발효대사와 숙주의 건강상태를 예측할 수 있다. Phylum 수준의 Firmicutes는 사료 분해와 직접적인 관련이 있으며 [21], Tajima 등 (2007) [22]에 따르면 온도 변화에 따른 반추위 내 미생물 비교 분석 결과, 온도가 높아질수록 Bacteroidetes와 Firmicutes의 상대적 함량이 각각 증가하고 감소한다고 하였다. 이번 연구의 고온기의 대조구와 코발트 첨가구의 반추위 내 phylum 수준의 미생물 군집 변화 결과, Bacteroidetes, Firmicutes 및 Proteobacteria가 가장 높은 군집 비율을 보였으며, 그중 Bacteroidetes 비율은 대조구에 비해 코발트 첨가구에서 증가하였으나, Firmicutes는 코발트 첨가구에서 증가하는 결과를 보였다 (Figure 1).

이번 연구에서 genus 수준의 Ruminococcus와 species 수준의 Ruminococcus sp. JE7A12 군집은 코발트 첨가구에서 높은 비율을 보였으며 ($p < 0.05$), genus 수준의 Desulfovibrio 군집은 대조구에서 높은 비율을 보였다 ($p < 0.05$). 또한 Acetate 생성 관련 미생물인 Anaeroplasma와 Shuttleworthia 군집은 두 그룹 간 차이를 보이지 않았지만, phylum 수준의 Acetivibacteria 군집은 코발트 첨가구에서 높은 비율을 보였다 ($p < 0.05$). Proteolytic 계열 bacteria는 반추위 내 NH₃-N과 관련이 있으며, 고온기에서 농도가 감소한다고 알려져 있다. 이번 연구의 NH₃-N 농도는 고온기의 대조구에서 낮았으며 ($p < 0.05$), phylum 수준의 Proteobacteria, class 수준의 alpha-proteobacteria, beta-proteobacteria, gamma-proteobacteria 및 delta-proteobacteria의 군집 또한 대조구에서 낮은 비율을 보였다 ($p < 0.05$).

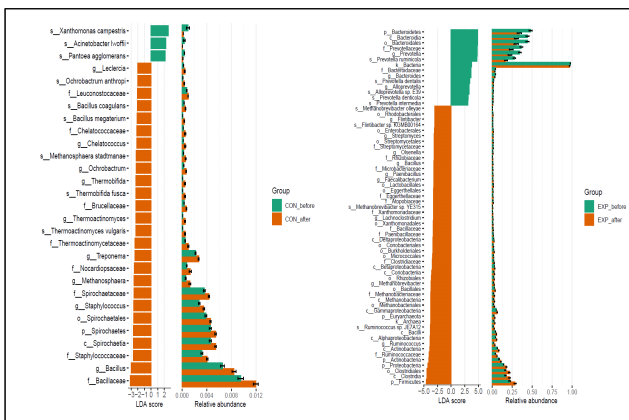


[Figure 1] Comparison between control and experiment group for individual microbial composition analyses: top 10 phylum (left) and top 6 phylum (right).

고온기의 대조구와 코발트 첨가구의 반추위 내 유의적 차이를 보인 미생물 군집 변화 결과는 Figure 2, 3과 같다.



[Figure 2] LefSe analysis shows key features of each group.



[Figure 3] LefSe analysis to examine effects of control and experiment group conditions.

이번 연구를 통해 코발트 첨가 급여군에서 섬유소 분해, acetate 및 NH₃-N 농도 관련 미생물들의 군집 비율이 높은 것을 확인 할 수 있었으며, 이는 본 연구에서 나타난 반추위 발효 정상 결과를 뒷받침 할 수 있는 결과가 될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

[1] Hammami H, Bormann J, M'hamdi N, Montaldo HH, Gengler N, "Evaluation of heat stress effects on production traits and somatic cell score of Holsteins in a temperate environment", *Journal of Dairy Science*;96:1844-1885, 2013, <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5947>

[2] Sammad A, Wang YJ, Umer S, Lirong H, Khan I, Khan A, Ahmad B, Wang Y, "Nutritional physiology and biochemistry of dairy cattle under the influence of heat stress: Consequences and opportunities", *Animals*;10:793, 2020. <https://doi.org/10.3390/ani10050793>

[3] St-Pierre NR, Cobanov B, Schnitkey G, "Economic losses from heat stress by US livestock

industries", *Journal of Dairy Science*;86:E52-E57, 2003. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)74040-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)74040-5)

[4] Del Río-Avilés et al., "Effects of an injectable mineral supplement on physiological responses and milk production of heat-stressed Holstein cows", *Journal of Animal Behaviour and Biometeorology*;9:2116, 2021. <http://dx.doi.org/10.31893/jabb.21016>

[5] Son AR, Kim SH, Islam M, Oh SJ, Paik MJ, Lee SS, Lee SS, "Higher concentration of dietary selenium, zinc, and copper complex reduces heat stress-associated oxidative stress and metabolic alteration in the blood of Holstein and Jersey steers", *Animals*;12:3104, 2020. <https://doi.org/10.3390/ani12223104>

[6] Goff JP, "Determining the mineral requirement of dairy cattle", In *Proceedings of the 11th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium, University of Florida, Gainesville, FL, USA, 13 - 14 January 2000*; pp. 106 - 132.

[7] Graulet B, Matte JJ, Desrochers A, Doepel L, Palin MF, Girard CL, "Effects of dietary supplements of folic acid and vitamin B12 on metabolism of dairy cows in early lactation", *Journal of Dairy Science*;90:3442 - 3455. 2007. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-718>

[8] National Research Council, *Nutrient requirements of dairy cattle: 2001*, 482, National Academies Press, 2001;482. <https://doi.org/10.17226/9825>

[9] Lopez-Guisa JM, Satter LD, "Effect of copper and cobalt addition on digestion and growth in heifers fed diets containing alfalfa silage or corn crop residues", *Journal of Dairy Science*;75:247-256, 1992. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)77759-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)77759-5)

[10] Nagabhushana V, Sharma K, Pattanaik AK, Dutta N, "Effect of cobalt supplementation on performance of growing calves", *Veterinary World*;1:299-302, 2008.

[11] Casper DP, Pretz JP, Purvis HT, "Supplementing additional cobalt as cobalt lactate in a high-forage total mixed ration fed to late-lactation dairy cows", *Journal of Dairy Science*;104:10669-10677, 2021. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20252>

[12] Akins MS, Bertics SJ, Socha MT, Shaver RD, "Effects of cobalt supplementation and vitamin B12 injections on lactation performance and metabolism of Holstein dairy cows", *Journal of Dairy Science*;96:1755-1768, 2013. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5979>

[13] Park J, Ryu GL, Jeon E, Kim DH, Kim E, "Effects of feeding extra co-glucoheptonate on physiology characteristics of Holstein cows", *Journal of the Korea*

Academia-Industrial cooperation Society;24:470-476,
2023. <https://doi.org/10.5762/KAIS.2023.24.11.470>

[14] AOAC, “Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists”, AOAC International: Gaithersburg, MD, USA, 2003.

[15] Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA, “Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition”, *Journal of Dairy Science*;74:3583 - 3597, 1991.
[http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)

[16] Batistel F, Osorio JS, Ferrari A, Trevisi E, Socha MT, Loor JJ, “Immunometabolic status during the peripartum period is enhanced with supplemental Zn, Mn, and Cu from amino acid complexes and Co from Co glucoheptonate”, *PLoS One*;11:e0155804. 2016.
<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0155804>

[17] Shen JS, Chai Z, Song LJ, Liu JX, Wu YM, “Insertion depth of oral stomach tubes may affect the fermentation parameters of ruminal fluid collected in dairy cows”, *Journal of Dairy Science*;95:5978-5984, 2012.
<https://doi.org/10.3168/jds.2012-5499>.

[18] Chaney AL, Marbach EP, “Modified reagents for determination of urea and ammonia”, *Clinical Chemistry*;8:130-132. 1962.
<https://doi.org/10.1093/clinchem/8.2.130>

[19] Erwin ES, Marco GJ, Emery EM, “Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography”, *Journal of Dairy Science*;44:1768-1771, 1961. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(61\)89956-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(61)89956-6)

[20] Hall MB, “Heat stress alters ruminal fermentation and digesta characteristics, and behavior in lactating dairy cattle”, In *Proceeding of 11th International Symposium on Ruminant Physiology*, Wageningen Academic Publ., Wageningen, the Netherlands pp. 204, 2009.

[21] Chen, Y.; Penner, G.B.; Li, M.; Oba, M, “Changes in bacterial diversity associated with epithelial tissue in the beef cow rumen during the transition to a high-grain diet”, *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 5770 - 5781, 2011.

[22] Tajima K, Nonaka I, Higuchi K, Takusari N, Kurihara M, Takenaka A, Aminov RI, “Influence of high temperature and humidity on rumen bacterial diversity in Holstein heifers”, *Anaerob*;13:57-64, 2007.
<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2006.12.001>