

영양 대사체학

- 총 설 -

홍 영 식

한국기초과학지원연구원 자기공명연구단

Nutritional Metabolomics

Young-Shick Hong

Div. of Magnetic Resonance, Korea Basic Science Institute, Chungbuk 363-883, Korea

ABSTRACT Metabolomics is the study of changes in the metabolic status of an organism as a consequence of drug treatment, environmental influences, nutrition, lifestyle, genetic variations, toxic exposure, disease, stress, etc, through global or comprehensive identification and quantification of every single metabolite in a biological system. Since most chronic diseases have been demonstrated to be linked to nutrition, nutritional metabolomics has great potential for improving our understanding of the relationship between disease and nutritional status, nutrient, or diet intake by exploring the metabolic effects of a specific food challenge in a more global manner, and improving individual health. In particular, metabolite profiling of biofluids, such as blood, urine, or feces, together with multivariate statistical analysis provides an effective strategy for monitoring human metabolic responses to dietary interventions and lifestyle habits. Therefore, studies of nutritional metabolomics have recently been performed to investigate nutrition-related metabolic pathways and biomarkers, along with their interactions with several diseases, based on animal-, individual-, and population-based criteria with the goal of achieving personalized health care in the future. This article introduces analytical technologies and their application to determination of nutritional phenotypes and nutrition-related diseases in nutritional metabolomics.

Key words: nutritional metabolomics, nutrition, metabolome, metabolite, personalized health care

서 론

영양은 건강에서 아주 기본이 되는 항목이다. 따라서 음식에서의 영양 성분들이 비만, 당뇨병, 동맥경화증, 고혈압 등과 같은 질병을 야기하거나 예방하기도 한다. 이러한 질병들은 주로 대사 불균형에서 오는 경우가 대부분이지만, 식품 섭취에 따른 대사 작용이 개인 간 차이가 뚜렷하고 식품 자체가 다양한 성분들로 이루어져 있기 때문에 식품 섭취에 의한 대사 작용과 질병의 상호작용에 대한 명확한 결론을 밝혀내기가 어렵다. 이러한 복잡한 환경을 극복하면서 영양과 질병과의 관계를 밝히기 위하여 역학적 접근방법(epidemiologic approach)을 통하여 식품 섭취나 생활 패턴에 따른 대사 메커니즘 연구가 최근 활발하게 진행되고 있어 향후 개인 맞춤형 건강관리 시스템을 확립함으로써 각 개인에 맞는 질병 치료나 음식 처방을 통하여 현재보다 더욱 건강해진 삶을 누릴 수 있을 것으로 기대되고 있다. 이 영양과 질병의 상호작용 그리고 개인 맞춤형 시스템을 위한 연구의 핵심 부분에 자리 잡고 있는 대사체학(metabolomics 혹은 metabonomics)이라는 새로운 연구 분야가 최근 활발하게 진행되고 있어(1), 앞으로 개인 맞춤형 시스템을 구축하는데 영

양 대사체학(nutritional metabolomics)의 역할이 매우 기대된다(2).

대사체(metabolome)라는 단어는 Oliver 등(3)에 의해 처음에 소개되었지만 대사체학은 영국 Imperial College London의 Nicholson 교수에 의해서 소개되고 본격적인 연구가 시작되었다(4). 최근 Nicholson 교수는 영국 정부로부터 막대한 예산을 지원받아 'National Phenome Center'를 설립하여 영국은 물론 해외 연구자들과 공동연구를 통하여 수백만 명의 정상인은 물론 환자의 생체 시료에서의 대사체 변화를 연구하는 대사 표현형(metabolic phenotype) 연구에 초점을 맞추어 대사체와 질병과의 연관성에 대한 연구를 진행하고 있다(5,6).

대사체학은 생체 시료인 뇨, 혈액, 대변, 인체 조직 등에 있는 대사산물(metabolite)을 전체적으로 한 번에 측정하여 얻어진 수십, 수백 개의 대사산물들의 조합으로 그 대사 메커니즘을 연구하는 학문이다. 이 과정에서 질병과 관련한 새로운 바이오 마커 물질이 나타나기도 하며, 식품이나 식물, 동물은 물론 임상에서까지 거의 모든 분야에 응용이 되고 있다(Fig. 1). 기존 분석법에서는 목적하는 물질 혹은 대사산물을 미리 지정해서 분석하는 것과는 달리 대사체학에서의 전체적인 대사산물 측정법은 새로운 대사 메커니즘 규명과 바이오 마커 발굴에 대한 가능성을 훨씬 높여준다. 전립선암과 관련한 새로운 바이오 마커의 발견(7) 그리고 당뇨

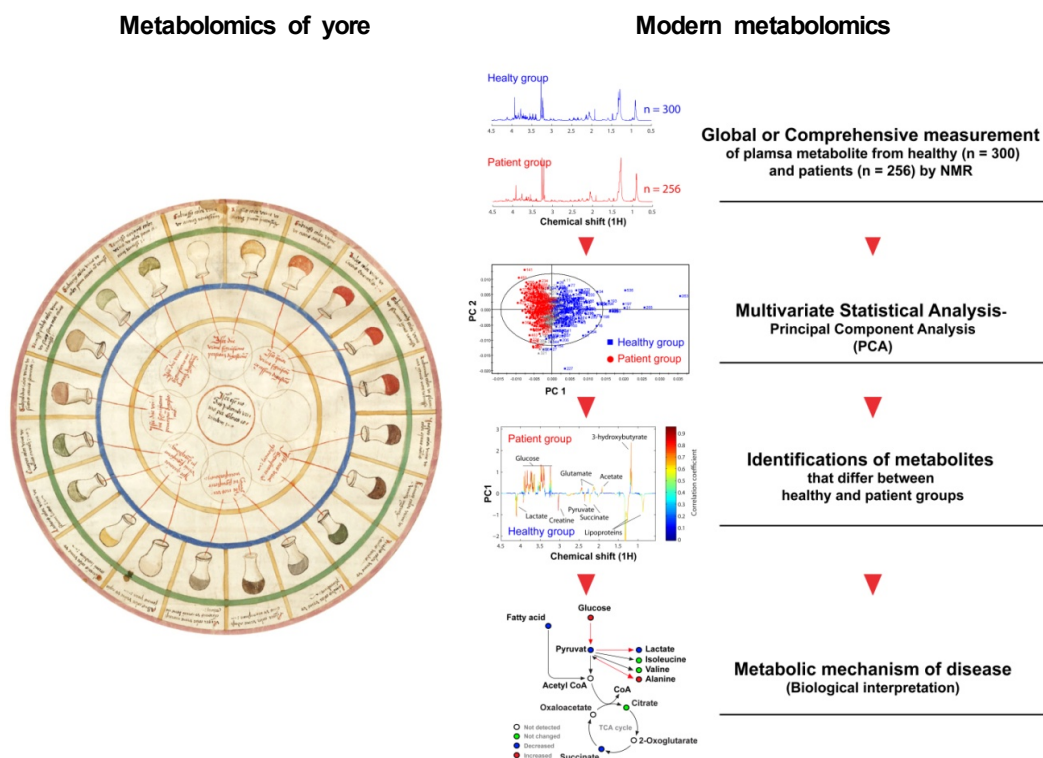


Fig. 1. Metabolomics of yore that describes the possible colors, smells, and tastes of urine to diagnose disease (left) (1) and a typical procedure of modern metabolomics that determines the metabolic perturbations of an organism in disease through global or comprehensive metabolite identification in biofluids such as blood, urine, and tissues and provides better understanding metabolic pathway related to disease (right).

병 발병에 대한 예측(8)에 대한 보고는 대표적인 대사체학 연구 결과라고 할 수 있다. 또한 장내 미생물과 우리 몸의 대사체의 변화 그리고 질병과의 관계가 서서히 밝혀지고 있어 향후 개인 맞춤형 질병 관리 혹은 건강관리 시스템을 구축하는데 많은 정보를 제공하고 있다(9-11). 유전체학(genomics)은 주로 개인의 유전자 분석에 중점을 두고 개인의 유전적 차이(inherited difference)에 의해 기인하는 질병에 관심을 두지만, 영양 대사체학은 생체 시료에서 나타나는 대사체의 변화에 관심을 두기 때문에 영양 섭취에 의해 실시간적으로 변화하는 대사 작용에 대한 결과를 더욱 효과적으로 제공할 수 있다.

대사체학 연구에서의 핵심은 목적하는 시료에서 전체적인 대사체를 분석할 수 있는 최신 분석 장비와 여기서 얻어지는 대용량의 데이터를 효과적으로 처리할 수 있는 통계기법이라고 할 수 있다. 대사체학 연구에서 가장 많이 사용되는 분석 장비는 NMR(nuclear magnetic resonance), LC-MS(liquid chromatography coupled with mass spectrometry) 그리고 GC-MS(gas chromatography with mass spectrometry)이다. NMR 기반 분석 기술은 높은 재현성과 최소한의 시료 전처리 그리고 분석한 시료의 재사용 가능 등의 장점이 있지만 많은 양의 시료가 필요하고 낮은 감도가 단점이다. LC-MS와 GC-MS는 감도가 높지만 GC-MS의 경우 휘발성 물질 성분의 분석에 적합하고 시료에 들

어 있는 성분들을 유도체화 시켜야 하는 단점이 있으며, LC-MS는 주로 지용성 물질 분석에 감도가 높고 적합하지만 물질 동정에 대한 어려움이 있다. 이렇게 대사체학에서의 3가지 주요 분석 기술들은 서로 장단점들을 가지고 있지만 각각의 장비들은 대사체학 분야에서 유용하게 사용되고 있다. 이러한 분석 장비에 의해서 얻어진 대용량 데이터는 주성분 분석법(principal component analysis, PCA; partial least-square discriminant analysis, PLS-DA; orthogonal partial least-square discriminant analysis, OPLS-DA)과 같은 다변량 통계기법(multivariate statistical analysis)을 이용하여 방대한 데이터를 단순화시키고 이해가 쉽게 결과를 보여준다. 또한 이 다변량 통계분석은 실험 대상 그룹간의 차이가 있는 대사산물들을 찾아내는데 매우 유용하다. 하지만 다변량 통계분석에 앞서 방대한 대사체 데이터를 preprocessing하는 과정을 반드시 거쳐야 하는 등의 주요 기법들이 선행되어야 한다. 본 총설에서는 NMR을 기반으로 하는 대사체학 연구 과정과 영양 대사체학과 관련된 최근 연구 현황을 소개하고자 한다.

대사체 분석 방법과 데이터 처리

대사체학 연구에서 쓰이는 분석 장비 가운데 하나인 NMR은 LC-MS나 GC-MS에 비하여 감도는 낮지만 재현성이 뛰

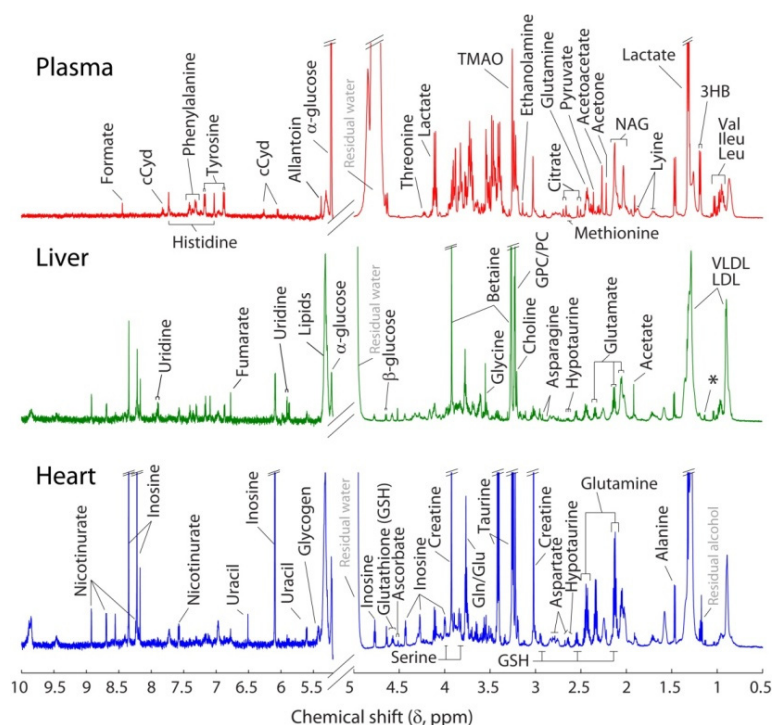


Fig. 2. Representative metabolite profiling of plasma and liver and heart tissues by ^1H NMR spectroscopy, highlighting global or comprehensive identification of a wide range of metabolites having different chemical characteristics such as amino acids, organic acid, sugars, lipids, and nucleotides. In particular, metabolites of liver and heart are directly identified from their intact tissues without any extraction procedure by ^1H NMR spectroscopy.

어나고 측정 시간이 짧으며 시료의 전처리가 필요 없는 장점을 가지고 있으며, 특히 간, 신장 및 심장 등 다양한 조직의 대사체 분석 시 추출 등의 전처리 과정 없이 조직을 직접 분석함으로써 조직 시료에서의 수많은 대사산물 분석을 가능하게 한다(Fig. 2). 대사체학 연구에서 NMR, LC-MS 그리고 GC-MS를 이용하여 대사산물 분석을 위한 시료 전처리 방법과 분석기기 사용에 대한 내용들은 이미 많이 알려져 있다(12-15). LC-MS, GC-MS 그리고 NMR 모두 대사체학 연구에서 대사체를 한 번에 스크리닝하는 분석 장비이기 때문에 방대한 데이터가 필수적으로 생성되며 이 데이터로 다변량 분석 기법을 통하여 대사체의 변화를 쉽게 판단할 수 있다. 이 다변량 분석을 위해서는 분석 장비를 통해 얻어진 대용량 데이터의 peak alignment, normalization 등 몇 가지 선행되어야 하는 과정이 있다. 각 시료의 스펙트럼에서 동일한 대사산물에 해당하는 peak는 동일한 위치에 있어야 하지만, 시료의 pH나 NMR 측정 장비의 미미한 온도 차이나 자장(magnetic field) 등 여러 원인에 의하여 서로 다른 위치에 있는 경우 동일한 위치에 있도록 해주어야 한다(alignment of peaks shifted). 이러한 과정에서는 특별한 컴퓨터 소프트웨어가 사용되는데, 최근까지 이를 위한 몇 가지 프로그램이 개발되어 유용하게 사용되고 있다(16-18). Fig. 3은 NMR을 이용한 혈액 분석 시 각 혈액에서 일부 대사산물에 해당하는 피크의 shifting과 alignment 결과를 보여주고 있다. Peak alignment 없이 shifted peak들이 포함된 상태에서 다변량 분석을 실시할 경우 잘못된 통계결과가 나타날 수 있다(Fig. 4).

Data normalization은 주로 시료의 희석 효과에서 오는

차이를 제거하기 위하여 수행된다. 스펙트럼 전체 면적으로, 외부(creatine) 혹은 내부(TSP) 기준 물질을 기준으로, 또는 여러 개의 스펙트럼의 중간 값으로 normalization이 이루어진다. 이 중 creatine으로 normalization하는 경우는 혈액의 creatine 농도에 영향을 미치는 질병의 경우에는 부적합하고, TSP(NMR 측정 시 사용되는 외부 기준물질)로 normalization하는 경우에는 혈액이나 조직에 들어있는 단백질들이 TSP와 상호 반응을 하기 때문에 이 방법은 추천되지 않는다. 따라서 스펙트럼 전체의 면적값으로 normalization한 후 여러 개의 스펙트럼의 중간 값으로 normalization하는 방법이 적절하다(20,21).

다변량 통계 분석

다변량 통계 분석에서 변량(variables)은 각 분석 장비에서 검출된 대사산물에 해당되며, 대사체학 연구에서는 수많은 대사산물이 검출되기 때문에 다변량(multivariate)이라고 표현된다. 대사체학 연구에서 가장 많이 사용되는 다변량 통계 분석은 패턴 인식(pattern recognition)법 중 주성분 분석(principal component analysis, PCA) 방법이며, 여기서 주성분 분석은 많은 변수(variables 혹은 metabolites)의 분산 방식의 패턴을 간결하게 표현하는 주성분을 원래 변수의 선형결합으로써 추출하는 통계기법이다. 이외에 Partial Least Square(PLS) 회귀분석과 Orthogonal Partial Least Square(OPLS) 회귀분석법도 많이 사용되고 있다. 이러한 패턴 인식법들은 각 데이터의 시각화(visualization)를 극대화하고 실험구 간 차이가 있는 대사산물을 쉽게 찾을 수 있

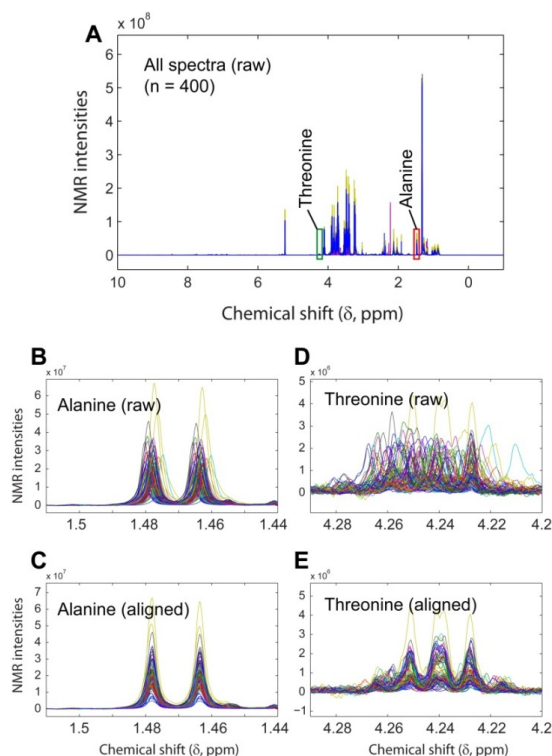


Fig. 3. Full resolution NMR raw spectra (n=400) of human plasma (A) and expanded peaks corresponding to alanine (B) and threonine (D) before (B and D) and after (C and E) peak alignment.

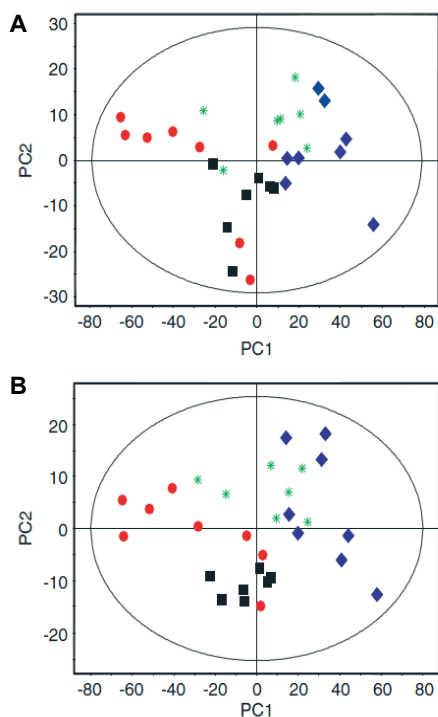


Fig. 4. PCA score plots derived from ^1H Magic Angle Spinning (MAS) NMR spectra of intact liver tissues of control (square), glycine-treated (circle), galactosamine (triangle) animals and animals treated with both glycine and galactosamine before (A) and after (B) peak alignment (19).

게 도와준다. 예를 들어 정상인과 특정 환자의 혈액을 NMR을 이용하여 대사체학 연구를 수행한 경우 주성분 분석 방법을 통하여 정상인과 환자들 사이의 명확한 구분이 나타날 수 있으며(Fig. 5A), 두 그룹 간 차이가 나는 혈액 대사산물들을 쉽게 찾아 낼 수 있다(Fig. 5B).

영양 대사체학

영양 대사체학은 사람이나 동물에서 영양 상태 혹은 영양 변화에 따라 생체 시료 즉, 혈액, 뇨, 대변 그리고 신체 조직에 있는 많은 대사체들이 어떻게 변화하고 질병과 연관되는지를 연구하는 학문이다. 영양 대사체학은 식이 변화와 생활 습관에 따라 우리 몸의 대사 반응을 추적하는데 아주 유용한 연구 분야라고 할 수 있다(Fig. 6). 최근 영양 대사체학에 대한 관심이 증가되면서 연구 방법에서부터 응용까지 영양 대사체학과 관련된 많은 결과들이 발표되고 있다(22-27). 영양 대사체학적 관점에서 보면 콩에서 유래된 isoflavones를 섭취했을 때 혈액과 뇨에서의 대사체 변화를 보고한 것이 가장 최초의 영양 대사체학 연구 결과라고 할 수 있다(28, 29). 이후 뇨의 대사체 분석을 통하여 식이와 고혈압과의 관계가 보고되었고, 각 나라의 식습관과 문화적 차이에서 오는 뇨의 대사체 차이도 발표되어 식이나 식생활 습관에 따라

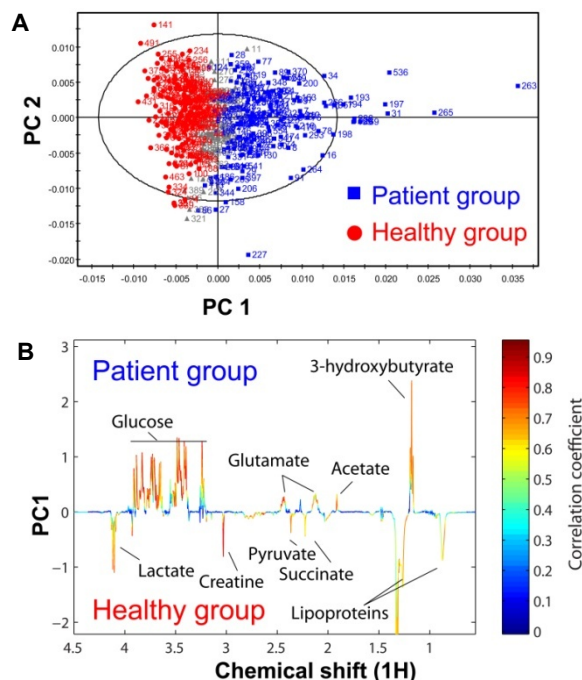


Fig. 5. PCA score (A) and loading (B) plots derived from ^1H NMR plasma spectra of healthy and patients, demonstrating clear metabolic differentiation between healthy and patient groups and identifications of plasma metabolites that differ between the two groups. In panel B, the upper section represents the higher levels of plasma metabolites in patient groups, compared to healthy group, whereas the lower section indicates the lower levels of plasma metabolites in patient group.

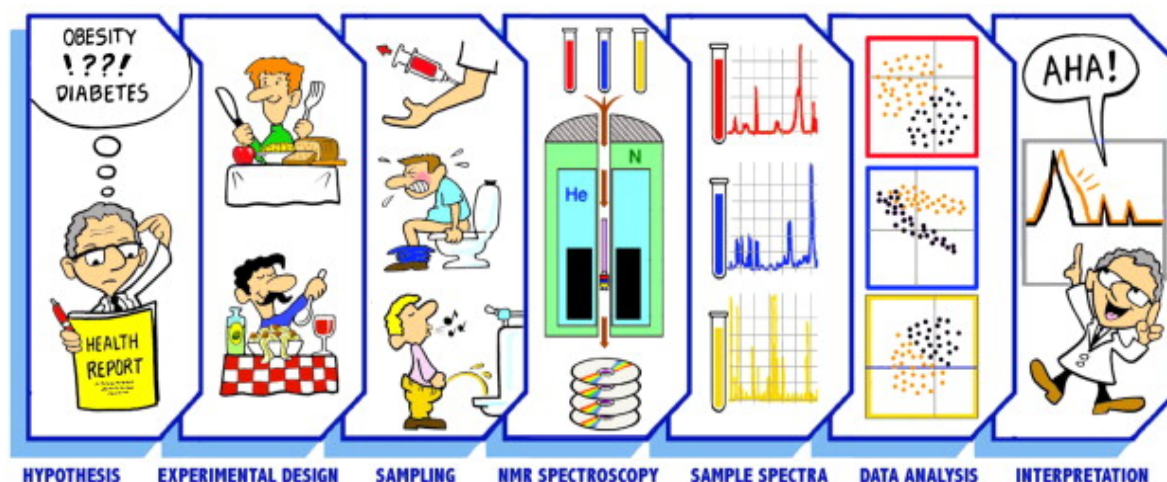


Fig. 6. The workflow of a nutritional metabolomics study: hypothesis, experimental design, sampling of biofluids such as blood, feces and urine, the analytical platform, the sample spectra, the multivariate data analysis, and the biological interpretation (21).

우리 몸의 대사체 변화 그리고 질병과의 밀접한 연관성들이 밝혀지고 있다(30,31). 또한 Savorani 등(22)은 영양 대사체학 연구에서 실험 디자인, 각 시료 수집, 대사체 데이터 수집 및 분석 등 영양 대사체학 연구에서의 유의 사항들을 소개하기도 했다.

식생활과 대사체학

대사체학에서는 식생활 차이에서 오는 대사 작용 변화에 대한 연구가 많이 진행되었다. 1,212명의 식단을 조사하고 고에너지 식단, 동·식물 식이 식단, 전통 식단, 당이 많은 식단의 5가지 식단과 관련된 대사 반응에 대한 연구에서 혈중 지질 대사와 아미노산 대사 차이가 나타났다(32). 이 연구는 수많은 사람을 대상으로 실질적인 식이 형태를 조사하고 이 식이 형태에 따른 대사체 변화나 차이를 연구한 결과로서 앞으로 영양 대사체학 관점에서 의미가 크다고 할 수 있다. 또한 식생활 패턴이 상이한 중국(Guangxi, 278명), 일본(Aito town, 259명), 미국(Chicago, 315명) 사람들의 노 대사체를 비교해본 결과 서로 간의 뚜렷한 대사 작용의 차이를 보였다(33). 특히 일본사람들의 노에서 높은 농도의 trimethylamine *N*-oxide(TMAO)가 발견되었는데, 이는 해당 지역 일본사람들이 물고기를 많이 먹기 때문이고 huppuric acid 등의 페놀성분의 차이는 각 나라 사람들의 장내 미생물 형태가 다르기 때문이며, 미국 시카고 사람들의 노에서 creatinine 성분이 높은 것은 미국사람들의 body mass가 크기 때문인 것으로 조사되었다. 이는 각 나라별 식생활 차이에 나오는 뚜렷한 대사 작용 차이라고 할 수 있다.

음식에 대한 갈망 혹은 집착에 따라서 우리 몸의 대사 작용 변화도 나타난다. 초콜릿에 대한 선호도가 강한 사람과 강하지 않은 사람들 사이에서 초콜릿을 강제적으로 섭취하지 못하게 하는 경우, 선호도가 강한 사람들의 혈액과 노 대사체 변화가 뚜렷하게 나타난다. 즉 에너지 항상성과 관련

된 대사산물인 lactate, citrate, succinate, *trans*-aconitate, urea 그리고 proline, 호르몬 대사와 관련된 대사산물인 DOPA, 3-methoxy-tyrosine, 그리고 장내 미생물 대사와 관련된 대사산물인 methylamines, *p*-creson sulfate 그리고 hippurate들의 차이가 뚜렷하게 나타났으며, 특히 다시 초콜릿을 섭취하였을 경우 초콜릿 선호도가 강한 사람들에게서 스트레스 호르몬 물질인 cortisol과 catecholamines가 감소하였다고 보고하였다(34-36). 이는 건강한 사람일지라도 일상생활에서 특정 음식의 섭취 유무에 따라 우리 몸의 대사 작용이 다르게 나타나게 되며, 심지어 원하는 음식을 못 먹게 되면 스트레스와 관련이 되기도 하고 장내 미생물 대사에까지 영향을 미친다고 할 수 있다.

정상인 혹은 정상 동물에서 특정 식이의 대사 작용 조절에 대한 연구는 현재까지 많이 보고되어 있지 않지만 대사체학 연구방법을 통하여 정상인이 쿡을 섭취했을 때 에너지 대사가 증가(28,29)한다고 보고가 되었고, 정상 쥐 동물에서 칼로리 제한 식이에 의한 혈중 HDL 증가, VLDL 감소 등 pentose 대사 작용에 영향에 대한 결과(37) 등은 앞으로 특정 기능성 식품의 역할이 대사 작용 관점에서 충분히 설명될 수 있을 것이다.

영양과 관련된 질병에 대한 대사체학 연구

현재의 정상인도 잘못된 식생활 등의 이유에 의해서 향후 질병으로 발전할 가능성이 항상 존재한다는 것도 대사체학 연구 결과를 통해서 알 수 있다. 예를 들어 혈중 아미노산들과 glutamine과 glutamate가 미래의 비만과 당뇨병 등의 대사 증후군과 관련이 있고(38-42), 혈중 isoleucine, leucine, valine, tyrosine 그리고 phenylalanine의 아미노산들은 미래의 당뇨병 발병 가능성에 대한 예측 마커로 보고되고 있다(8). 또한 phosphatidylcholine의 장내 미생물 대사 물질인 choline, trimethylamine *N*-oxide(TMAO) 그리고

betaine이 심장병 발병 가능성을 높일 수 있으며 이 과정에서 장내 미생물도 중요한 역할을 한다(43,44). 육고기에 많이 들어 있는 L-carnitine이 장내 미생물에 의해서 TMAO로 분해되어 동맥경화증 발병 가능성을 높이고 이어서 심장 질환의 원인이 되기도 한다(45). 이렇게 향후 질병 가능성에 대한 예측이 대사체학 연구를 통해서 가능해지고 있지만, 그 정확한 기작이나 발병 가능성을 낮추는 방법에 대해서는 아직 명확히 밝혀지지 않았다. 하지만 앞으로 대사체학 특히 영양학과 결합된 영양 대사체학 연구를 통해서 잘못된 식생활에서부터 기인하는 질병 발병 원인이나 기작이 밝혀지리라 생각된다. 따라서 현재의 건강이 정상 상태일지라도 이러한 질병 발병에 대한 마커를 통하여 앞으로의 개인 건강에 대한 관심을 가질 필요가 있다.

영양 대사체학에서는 식이 조절에 의해 특정 질병이 호전되는 지는 가능한 많은 대사체의 분석을 통하여 언어될 수 있는 대사 메커니즘의 변화에 의해 평가될 수 있다. 청국장 섭취에 의해 비만쥐의 혈액 지방 감소(46), catechin 섭취에 의한 비만쥐의 뇨에서 nicotinic acid 변화와 장내 미생물 환경 변화 그리고 이에 따른 항비만 효과 가능성(47) 등이 영양 대사체학 결과의 좋은 예가 된다.

인체의 대사 작용과 장내 미생물과 관련된 질환, 예를 들어 과민성 대장 질환(irritable bowel disease, IBD) 혹은 과민성 대장 증후군(irritable bowel syndrome, IBS) 그리고 비만 등에서의 장내 미생물과 대사체 변화의 연관성에 대한 연구는 대사체학 연구에서 주요 관심 분야 중 하나이다(48-50). 이미 장염 질환에 대한 장내 미생물 역할의 중요성이 발표되고 있고, 대사체학에서는 대사 메커니즘을 규명함으로써 관련된 증거 결과들을 보여주고 있다(51,52). 예를 들어 IBS 동물 모델에서는 혈액 대사 산물 중 lactate, citrate, alanine 성분 변화가 에너지 대사의 증가를 나타내고, acetoacetate, 3-D-hydroxybutyrate, lipoproteins는 소장에서의 fat mobilization의 증가를 설명하며, 소장 활동 이상에 의한 단백질 분해 증가로 인해 아미노산 성분들이 증가하는 등 전체적인 대사 작용에 이상 현상이 나타났음이 보고되었고, 신장 등 내장 기관의 기능 이상은 내장 기관 중 공장(jejunal)의 근육조직에서 taurine, creatine 그리고 glycerophosphorylcholine이 증가하는 것으로 설명되었다(53,54). 이러한 혈액과 내장 기관에서 발견된 대사 이상 작용은 유산균을 섭취하게 함으로써 정상으로 돌아간다고 보고되고 있다. 또한 IBS 환자의 혈액 대사체를 분석해 본 결과 IBS 환자에서 발견된 비정상적 glycolysis와 liver dysfunction이 유산균이 들어있는 요구르트를 8주간 섭취한 후 정상적으로 복귀되어 장내 미생물과 질병과의 직접적인 관계가 보고되기도 했다(55). 이처럼 장내 미생물과 개인의 대사 작용 간의 밀접한 연관성이 증명됨에 따라, 향후 장내 미생물을 조절함으로써 개인에 맞는 맞춤 치료의 가능성도 제기되고 있다(2,9,11,56).

요 약

대사체학이 질병, 약물, 스트레스, 식이, 생활습관, 유전적 차이, 장내 미생물 등에 의해서 발생하는 비정상적인 대사 메커니즘을 규명하고 관련 바이오 마커 발굴에 중요한 역할이 증명됨에 따라, 식품 영양학과 대사체학이 융합된 영양 대사체학의 역할이 더욱 중요해지고 있다. 특히 잘못된 식생활에 따른 미래의 질병 예측이 가능해지고 있어 향후 적절한 질병 예방이나 치료를 위한 적절한 식생활이나 식이에 대한 정보를 제공함으로써 건강 증진은 물론 개인별 맞춤식이나 맞춤형 약물 처방을 통한 개인 맞춤형 건강관리(personalized health care) 시대가 멀지 않았다. 또한 복잡한 식생활 패턴, 대사 반응에 대한 개인 간 차이 그리고 방대한 대사체 데이터와의 관계들을 효과적으로 밝혀낼 수 있는 기술에 대한 지속적인 개발과 영양 대사체학(nutritional metabolomics)이 유전체학(genomics or transcriptomics)과 단백체학(proteomics) 기술과 융합적으로 연구가 이루어질 때 질병과 식사 섭취 사이의 관계가 더욱 투명하게 규명될 것이다.

REFERENCES

- Nicholson JK, Lindon JC. 2008. Systems biology: Metabolomics. *Nature* 455: 1054-1056.
- Opinion. 2010. 2020 visions. *Nature* 463: 26-32.
- Oliver SG, Winson MK, Kell DB, Baganz F. 1998. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol* 16: 373-378.
- Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 1999. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* 29: 1181-1189.
- Saini A. 2012. Metabolomics. London's Olympic drug testing lab to become national phenome center. *Science* 337: 513.
- Nicholson JK, Holmes E, Kinross JM, Darzi AW, Takats Z, Lindon JC. 2012. Metabolic phenotyping in clinical and surgical environments. *Nature* 491: 384-392.
- Sreekumar A, Poisson LM, Rajendiran TM, Khan AP, Cao Q, Yu J, Laxman B, Mehra R, Lonigro RJ, Li Y, Nyati MK, Ahsan A, Kalyana-Sundaram S, Han B, Cao X, Byun J, Omenn GS, Ghosh D, Pennathur S, Alexander DC, Berger A, Shuster JR, Wei JT, Varambally S, Beecher C, Chinnaiyan AM. 2009. Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. *Nature* 457: 910-914.
- Wang TJ, Larson MG, Vasan RS, Cheng S, Rhee EP, McCabe E, Lewis GD, Fox CS, Jacques PF, Fernandez C, O'Donnell CJ, Carr SA, Mootha VK, Florez JC, Souza A, Melander O, Clish CB, Gerszten RE. 2011. Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nat Med* 17: 448-453.
- Nicholson JK, Holmes E, Kinross J, Burcelin R, Gibson G, Jia W, Pettersson S. 2012. Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science* 336: 1262-1267.
- Kinross J, Nicholson JK. 2012. Gut microbiota: Dietary and social modulation of gut microbiota in the elderly. *Nat Rev*

- Gastroenterol Hepatol* 9: 563-564.
11. Holmes E, Li JV, Marchesi JR, Nicholson JK. 2012. Gut microbiota composition and activity in relation to host metabolic phenotype and disease risk. *Cell Metab* 16: 559-564.
 12. Beckonert O, Keun HC, Ebbels TM, Bundy J, Holmes E, Lindon JC, Nicholson JK. 2007. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nat Protoc* 2: 2692-2703.
 13. Want EJ, Wilson ID, Gika H, Theodoridis G, Plumb RS, Shockcor J, Holmes E, Nicholson JK. 2010. Global metabolic profiling procedures for urine using UPLC-MS. *Nat Protoc* 5: 1005-1018.
 14. Beckonert O, Coen M, Keun HC, Wang Y, Ebbels TM, Holmes E, Lindon JC, Nicholson JK. 2010. High-resolution magic-angle-spinning NMR spectroscopy for metabolic profiling of intact tissues. *Nat Protoc* 5: 1019-1032.
 15. Dunn WB, Broadhurst D, Begley P, Zelena E, Francis-McIntyre S, Anderson N, Brown M, Knowles JD, Halsall A, Haselden JN, Nicholls AW, Wilson ID, Kell DB, Goodacre R. 2010. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat Protoc* 6: 1060-1083.
 16. Pearce JT, Athersuch TJ, Ebbels TM, Lindon JC, Nicholson JK, Keun HC. 2008. Robust algorithms for automated chemical shift calibration of 1D ^1H NMR spectra of blood serum. *Anal Chem* 80: 7158-7162.
 17. Savorani F, Tomasi G, Engelsen SB. 2010. icoshift: A versatile tool for the rapid alignment of 1D NMR spectra. *J Magn Reson* 202: 190-202.
 18. Veselkov KA, Lindon JC, Ebbels TM, Crockford D, Volynkin VV, Holmes E, Davies DB, Nicholson JK. 2009. Recursive segment-wise peak alignment of biological ^1H NMR spectra for improved metabolic biomarker recovery. *Anal Chem* 81: 56-66.
 19. Hong YS, Coen M, Rhode CM, Reily MD, Robertson DG, Holmes E, Lindon JC, Nicholson JK. 2009. Chemical shift calibration of ^1H MAS NMR liver tissue spectra exemplified using a study of glycine protection of galactosamine toxicity. *Magn Reson Chem* 47: S47-S53.
 20. Craig A, Cloarec O, Holmes E, Nicholson JK, Lindon JC. 2006. Scaling and normalization effects in NMR spectroscopic metabonomic data sets. *Anal Chem* 78: 2262-2267.
 21. Dieterle F, Ross A, Schlotterbeck G, Senn H. 2006. Probabilistic quotient normalization as robust method to account for dilution of complex biological mixtures. Application in ^1H NMR metabonomics. *Anal Chem* 78: 4281-4290.
 22. Savorani F, Rasmussen MA, Mikkelsen MS, Engelsen SB. 2013. A primer to nutritional metabolomics by NMR spectroscopy and chemometrics. *Food Res Int* 54: 1131-1145.
 23. McNiven EM, German JB, Slupsky CM. 2011. Analytical metabolomics: nutritional opportunities for personalized health. *J Nutr Biochem* 22: 995-1002.
 24. Brennan L. 2013. Metabolomics in nutrition research: current status and perspectives. *Biochem Soc Trans* 41: 670-673.
 25. Ismail NA, Posma JM, Frost G, Holmes E, Garcia-Perez I. 2013. The role of metabonomics as a tool for augmenting nutritional information in epidemiological studies. *Electrophoresis* 34: 2776-2786.
 26. Montoliu I, Genick U, Ledda M, Collino S, Martin FP, le Coutre J, Rezzi S. 2013. Current status on genome-metabolome-wide associations: an opportunity in nutrition research. *Genes Nutr* 8: 19-27.
 27. Jones DP, Park Y, Ziegler TR. 2012. Nutritional metabolomics: progress in addressing complexity in diet and health. *Annu Rev Nutr* 32: 183-202.
 28. Solanky KS, Bailey NJ, Beckwith-Hall BM, Davis A, Bingham S, Holmes E, Nicholson JK, Cassidy A. 2003. Application of biofluid ^1H nuclear magnetic resonance-based metabonomic techniques for the analysis of the biochemical effects of dietary isoflavones on human plasma profile. *Anal Biochem* 323: 197-204.
 29. Solanky KS, Bailey NJ, Beckwith-Hall BM, Bingham S, Davis A, Holmes E, Nicholson JK, Cassidy A. 2005. Biofluid ^1H NMR-based metabonomic techniques in nutrition research—metabolic effects of dietary isoflavones in humans. *J Nutr Biochem* 16: 236-244.
 30. Holmes E, Loo RL, Stamler J, Bictash M, Yap IK, Chan Q, Ebbels T, De Iorio M, Brown IJ, Veselkov KA, Daviglus ML, Kesteloot H, Ueshima H, Zhao L, Nicholson JK, Elliott P. 2008. Human metabolic phenotype diversity and its association with diet and blood pressure. *Nature* 453: 396-400.
 31. Lenz EM, Bright J, Wilson ID, Hughes A, Morrisson J, Lindberg H, Lockton A. 2004. Metabonomics, dietary influences and cultural differences: a ^1H NMR-based study of urine samples obtained from healthy British and Swedish subjects. *J Pharm Biomed Anal* 36: 841-849.
 32. Peré-Trepát E, Ross AB, Martin FP, Rezzi S, Kochhar S, Hasselbalch AL, Kyvik KO, Sørensen TIA. 2010. Chemometric strategies to assess metabonomic imprinting of food habits in epidemiological studies. *Chemom Intell Lab Syst* 104: 95-100.
 33. Dumas ME, Maibaum EC, Teague C, Ueshima H, Zhou B, Lindon JC, Nicholson JK, Stamler J, Elliott P, Chan Q, Holmes E. 2006. Assessment of analytical reproducibility of ^1H NMR spectroscopy based metabonomics for large-scale epidemiological research: the INTERMAP Study. *Anal Chem* 78: 2199-2208.
 34. Martin FP, Rezzi S, Pere-Trepát E, Kamlage B, Collino S, Leibold E, Kastler J, Rein D, Fay LB, Kochhar S. 2009. Metabolic effects of dark chocolate consumption on energy, gut microbiota, and stress-related metabolism in free-living subjects. *J Proteome Res* 8: 5568-5579.
 35. Martin FP, Montoliu I, Nagy K, Moco S, Collino S, Guy P, Redeuil K, Scherer M, Rezzi S, Kochhar S. 2012. Specific dietary preferences are linked to differing gut microbial metabolic activity in response to dark chocolate intake. *J Proteome Res* 11: 6252-6263.
 36. Martin FP, Antille N, Rezzi S, Kochhar S. 2012. Everyday eating experiences of chocolate and non-chocolate snacks impact postprandial anxiety, energy and emotional states. *Nutrients* 4: 554-567.
 37. Rezzi S, Martin FP, Shanmuganayagam D, Colman RJ, Nicholson JK, Weindruch R. 2009. Metabolic shifts due to long-term caloric restriction revealed in nonhuman primates. *Exp Gerontol* 44: 356-362.
 38. Newgard CB, An J, Bain JR, Muehlbauer MJ, Stevens RD, Lien LF, Haqq AM, Shah SH, Arlotto M, Slentz CA, Rochon J, Gallup D, Ilkayeva O, Wenner BR, Yancy WS Jr, Eisenson H, Musante G, Surwit RS, Millington DS, Butler MD, Svetkey LP. 2009. A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance. *Cell Metab* 9: 311-326.
 39. Suhre K, Meisinger C, Doring A, Altmaier E, Belcredi P, Gieger C, Chang D, Milburn MV, Gall WE, Weinberger

- KM, Mewes HW, Hrahe de Angelis M, Wichmann HE, Kronenberg F, Adamski J, Illig T. 2010. Metabolic footprint of diabetes: a multiplatform metabolomics study in an epidemiological setting. *PLoS One* 5: e13953.
40. Huffman KM, Shah SH, Stevens RD, Bain JR, Muehlbauer M, Slentz CA, Tanner CJ, Kuchibhatla M, Houmard JA, Newgard CB, Kraus WE. 2009. Relationships between circulating metabolic intermediates and insulin action in overweight to obese, inactive men and women. *Diabetes Care* 32: 1678-1683.
 41. Boulange CL, Claus SP, Chou CJ, Collino S, Montoliu I, Kochhar S, Holmes E, Rezzi S, Nicholson JK, Dumas ME, Martin FP. 2013. Early metabolic adaptation in C57BL/6 mice resistant to high fat diet induced weight gain involves an activation of mitochondrial oxidative pathways. *J Proteome Res* 12: 1956-1968.
 42. Cheng S, Rhee EP, Larson MG, Lewis GD, McCabe EL, Shen D, Palma MJ, Roberts LD, Dejam A, Souza AL, Deik AA, Magnusson M, Fox CS, O'Donnell CJ, Vasan RS, Melander O, Clish CB, Gerszten RE, Wang TJ. 2012. Metabolite profiling identifies pathways associated with metabolic risk in humans. *Circulation* 125: 2222-2231.
 43. Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, Koeth R, Levison BS, DuGar B, Feldstein AE, Britt EB, Fu X, Chung YM, Wu Y, Schauer P, Smith JD, Allayee H, Tang WHW, DiDonato JA, Lusis AJ, Hazen SL. 2011. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature* 472: 57-63.
 44. Tang WHW, Wang Z, Levison BS, Koeth RA, Britt EB, Fu X, Wu YW, Hazen SL. 2013. Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 368: 1575-1584.
 45. Koeth RA, Wang Z, Levison BS, Buffa JA, Org E, Sheehy BT, Britt EB, Fu X, Wu Y, Li L, Smith JD, DiDonato JA, Chen J, Li H, Wu GD, Lewis JD, Warrier M, Brown JM, Krauss RM, Tang WHW, Bushman FD, Lusis AJ, Hazen SL. 2013. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med* 19: 576-585.
 46. Kim J, Choi JN, Choi JH, Cha YS, Muthaiya MJ, Lee CH. 2013. Effect of fermented soybean product (*Cheonggukjang*) intake on metabolic parameters in mice fed a high-fat diet. *Mol Nutr Food Res* 57: 1886-1891.
 47. Fardet A, Llorach R, Martin JF, Besson C, Lyan B, Pujos-Guillot E, Scalbert A. 2008. A liquid chromatography-quadropole time-of-flight (LC-QTOF)-based metabolomic approach reveals new metabolic effects of catechin in rats fed high-fat diets. *J Proteome Res* 7: 2388-2398.
 48. Martin FP, Sprenger N, Yap IK, Wang Y, Bibiloni R, Rochat F, Rezzi S, Cherbut C, Kochhar S, Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. 2009. Panorganismal gut microbiome-host metabolic crosstalk. *J Proteome Res* 8: 2090-2105.
 49. Waldram A, Holmes E, Wang Y, Rantalainen M, Wilson ID, Tuohy KM, McCartney AL, Gibson GR, Nicholson JK. 2009. Top-down systems biology modeling of host metabolite-microbiome associations in obese rodents. *J Proteome Res* 8: 2361-2375.
 50. An Y, Xu W, Li H, Lei H, Zhang L, Hao F, Duan Y, Yan X, Zhao Y, Wu J, Wang Y, Tang H. 2013. High-fat diet induces dynamic metabolic alterations in multiple biological matrices of rats. *J Proteome Res* 12: 3755-3768.
 51. Wang Y, Utzinger J, Saric J, Li JV, Burckhardt J, Dirnhofer S, Nicholson JK, Singer BH, Brun R, Holmes E. 2008. Global metabolic responses of mice to *Trypanosoma brucei* infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 6127-6132.
 52. Yap IK, Li JV, Saric J, Martin FP, Davies H, Wang Y, Wilson ID, Nicholson JK, Utzinger J, Marchesi JR, Holmes E. 2008. Metabonomic and microbiological analysis of the dynamic effect of vancomycin-induced gut microbiota modification in the mouse. *J Proteome Res* 7: 3718-3728.
 53. Martin FP, Verdu EF, Wang Y, Dumas ME, Yap IK, Cloarec O, Bergonzelli GE, Corthesy-Theulaz I, Kochhar S, Holmes E, Lindon JC, Collins SM, Nicholson JK. 2006. Transgenomic metabolic interactions in a mouse disease model: interactions of *Trichinella spiralis* infection with dietary *Lactobacillus paracasei* supplementation. *J Proteome Res* 5: 2185-2193.
 54. Martin FP, Wang Y, Sprenger N, Holmes E, Lindon JC, Kochhar S, Nicholson JK. 2007. Effects of probiotic *Lactobacillus paracasei* treatment on the host gut tissue metabolic profiles probed via magic-angle-spinning NMR spectroscopy. *J Proteome Res* 6: 1471-1481.
 55. Hong YS, Hong KS, Park MH, Ahn YT, Lee JH, Huh CS, Lee J, Kim IK, Hwang GS, Kim JS. 2011. Metabonomic understanding of probiotic effects in humans with irritable bowel syndrome. *J Clin Gastroenterol* 45: 415-425.
 56. Nicholson JK, Holmes E, Wilson ID. 2005. Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care. *Nat Rev Microbiol* 3: 431-438.