

## Analysis of selenoaminoacids and selenoproteins in blood serum of sows fed by selenium fortified feed

Myungsoon Park, Sung Hoon Lee<sup>1</sup> and Yong-Nam Pak<sup>★</sup>

Department of Chemistry Education, Korea National University of Education,  
Cheng-Won, Chung Buk 363-791, Korea

<sup>1</sup>Livestock Experiment Station, Gyung-sangnam-do Livestock production Research Institute,  
Sinan, Sancheong 660-985, Korea

(Received May 8, 2015; Revised May 18, 2015; Accepted May 18, 2015)

## 셀레늄강화 사료를 먹인 모돈 혈청에서의 셀레노아미노산 및 셀레노단백질 분석

박명순 · 이성훈<sup>1</sup> · 박용남<sup>★</sup>

한국교원대학교 화학교육과, <sup>1</sup>경상남도 축산진흥연구소 축산시험장  
(2015. 5. 8. 접수, 2015. 5. 18. 수정, 2015. 5. 18. 승인)

**Abstract:** Selenium species (inorganic selenium, selenoaminoacids, and selenoproteins) were analyzed using anion exchange and affinity chromatography, which were connected to ICP/MS for the blood serum of sows fed by selenium-fortified feed. The Anion Exchange PRP X-100 column was used for the analysis of inorganic selenium ( $\text{Se}^{4+}$  and  $\text{Se}^{6+}$ ) and selenoaminoacids. The HEP column was used to separate SelP from GPx+SeAlb in selenoproteins. A quantitative analysis was performed using the post-column isotope dilution technique. The lactating sows were divided into three groups and fed by selenium fortified feed (organic 0.3 mg/kg, 0.6 mg/kg and inorganic 0.6 mg/kg) for four weeks. The test groups showed increases in selenoaminoacids compared with the control group, except the inorganic feed group. There was no significant difference between the organic feed groups. All test groups showed increases in selenoproteins. In particular, SelP showed a large increase that was 1.5 times higher than the other proteins.

**요 약:** 셀레늄 강화 사료를 먹인 모돈에 대하여 혈청에서의 셀레늄 화학종들 즉, 무기셀레늄, 셀레노아미노산 및 셀레노단백질들을 음이온 교환과 친화 크로마토 그래피를 ICP/MS에 연결사용하여 분석하였다. 무기 셀레늄( $\text{Se}^{4+}$ 와  $\text{Se}^{6+}$ )과 셀레노 아미노산들은 PRP X-100 음이온 교환 컬럼을 사용하였고 셀레노 단백질들의 경우에는 HEP 컬럼을 사용하여 SelP을 GPx+SeAlb로 부터 분리하였다. 정량분석은 후 컬럼 동위원소 희석법을 사용하여 이 들의 농도를 결정하였다. 모돈 실험군을 3 그룹으로 나누고 셀레늄이 강화된 사료(유기셀레늄 0.3 mg/kg, 0.6 mg/kg 및 무기셀레늄 0.6 mg/kg)를 4주 동안 먹었을 때 셀레늄 화학종들의 변화 및 사료와의 상관관계를 알아보았다. 셀레노 아미노산의 경우, 실험군들은 무기셀레늄 강화사료를 제외하고 대조군에 비하여 높은 농도를 보여주었다. 유기셀레늄 강화사료에서는 큰 차이를

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)43-230-3732 Fax : +82-(0)43-232-7176

E-mail : pakyn@knue.ac.kr

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

보이지 않았다. 셀레노 단백질의 경우는 실험군 모두가 대조군에 비하여 증가를 보여주었는데 특히 SelP가 다른 단백질에 비하여 1.5 배 정도 더 크게 증가한 것으로 나타났다.

**Key words:** sow blood serum, AE & AF HPLC-ICP/MS, selenoproteins, selenoaminoacids, selenium fortified feed

## 1. 서 론

셀레늄은 인체의 건강과 관련하여 비교적 근래에 알려지게 된 중요한 극미량 필수원소로서 '21세기의 비타민'이라고도 불린다. 이에 따라 셀레늄에 관한 많은 연구들이 진행되었고<sup>1-5</sup> 수년간 대규모집단을 대상으로 하여 셀레늄섭취와 암의 상관관계 및 건강 관련 연구들<sup>6-8</sup>이 보고되었다. 지금까지 셀레늄에 대한 연구는 원소분석에서부터 시작하여 셀레늄을 포함한 아미노산과 단백질의 연구에까지 이르기까지 매우 폭넓게 진행되고 있다.<sup>9-16</sup> 현재까지의 연구를 종합해 보면 생체에서 셀레늄을 적정수준으로 유지하는 것이 필요하고 부족하면 건강에 지장이 있으며 저항력이 떨어지는 것을 알게 되었다. 따라서 인체나 가축의 건강을 위하여 식품으로부터 충분한 셀레늄을 섭취하여야 하며 필요하면 셀레늄 강화제를 통하여 적절한 수준을 유지하는 것이 요구된다.<sup>17,18</sup>

셀레늄의 연구는 가축이나 식물에 대한 영양학적인 측면에서의 연구들이 먼저 진행되어 왔으며 이에 따라 셀레늄을 사료에 혼합하여 가축을 키웠을 때에 대한 연구들이 많이 보고된 편이다. 주로 사료의 형태에 따른 연구, 셀레늄 강화 사료를 먹인 가축들의 성장과 질병과의 관계, 그리고 육질의 변화등에 대한 연구들이 발표되었다.<sup>19-23</sup>

초기에는 총 셀레늄의 양을 조사하였지만 나중에는 어떤 형태의 셀레늄을 사료에 혼합하느냐에 대한 연구가 진행되었는데 무기물보다는 유기물형태가 가축의 성장에 더 효과적이었다. Travnicek 등<sup>23</sup>은 양에게 셀레늄이 강화된 *Alga Chlorella*를 육돈에 일정 기간 먹인 뒤에 혈청에서의 셀레늄량을 NAA (neutron activation analysis)와 형광광도법으로 조사하였다. 6개월간 0.18 mg/kg 무기 셀레늄 또는 0.180 mg/kg 셀레늄 강화 클로렐라를 먹인 뒤, 결과를 보면 각 114.2 µg/kg와 103.1 µg/kg로서 바탕 68.6 µg/kg와 비교해 보면 확연한 증가를 가져온다고 보고하였다. 하지만 이 유형의 연구는 단순히 총 셀레늄량을 조사한 것이다.

국내에서는 이성훈등<sup>21</sup>은 셀레늄을 함유한 청보리를

사료로 급여하였을 때의 육성돈의 생산성과 혈액성상에 대하여 연구하였는데 청보리를 급여하였을 때에 급여군이 대조군보다 셀레늄의 농도가 증가하였다. Jang의 연구<sup>22</sup>에 의하면 유기셀레늄이라 하더라도 이스트나 단백질의 종류에 따라 생물학적 섭취도가 다르며 또한 셀레늄이 신장이나 간등에 주로 축적됨을 밝혔고 혈청에도 셀레늄의 농도가 증가함을 보였다. 생체내에서 셀레늄은 유기형태의 여러 화학종으로 존재할 수 있으며 따라서 공급되는 사료와 생체내에서의 셀레늄 화학종의 상관관계에 대한 정보는 중요함에도 불구하고 아직 연구가 거의 진행되고 있지 않다.

현재까지의 연구에서는 섭취한 셀레늄이 생체내에서 어떤 화학종으로 전환되어 농도가 변화되는지 알 수 없었다. 예를 들어, Travnicek의 연구<sup>23</sup>에서는 혈액에서 알부민의 생성이 증가하고 리피드가 감소하는 것은 관찰하였지만 분석방법의 한계로 혈청에서의 셀레늄을 포함한 단백질이 얼마나 증가하는지 또는 어떤 종류의 셀레노 단백질이 존재하며 어떻게 변화하는지 등에 대한 자세한 연구는 불가능하였다. 권오석의 연구<sup>24</sup>에서는 셀레늄강화 이스트를 5주간 비육돈에 급여한 뒤에 여러 조직에서의 셀레늄의 함량과 혈청내에서의 글루타티온 과산화효소인 GPx (Glutathione Peroxidase)의 활성을 조사하였다. 결과는 대조군에 비하여 일부 조직(신장, 간)에서 더 높은 함량을 보였고, GPx의 활성도는 약간 차이가 있었지만 통계적으로 현저하지는 않았다. 이 연구에서도 GPx의 활성도는 알아내었지만 다른 셀레늄이 포함된 단백질인 셀레노 단백질에 대하여서는 알 수 가 없었다. 즉, 셀레늄의 총량을 분석할 뿐, 어떤 형태로 얼마씩 변화하는지에 대한 연구는 진행되지 못하였다. 결론적으로 셀레늄 강화 사료섭취와 GPx의 상관관계에 대한 연구, 또는 알부민에 대한 연구들은 있지만 이들이 과연 셀레노 단백질인지 아니면 단순한 단백질인지에 대한 정보는 얻을 수 없었다. 무엇보다 셀레늄을 섭취할 때에 생체내에는 어떠한 화학종이 얼마나 직접적으로 영향을 받는지에 대한 연구들이 필요하다. 본 연구에서는 셀레늄 강화사료를 먹었을 때에 사료와 가축의 혈청

에서의 여러 셀레늄 화학종들 즉, 무기 셀레늄이나 셀레노아미노산(Selenocystein, Selenomethinine등) 또는 셀레노 단백질(GPx, SelenoAlbumin; SeAlb, selenoprotein; SelP)과의 관계를 알아내는 연구를 시도하였다.

혈청을 이용하여 화학종들을 분석하는 연구는 몇가지 장점을 갖고 있다. 즉, 생체에서 시료를 채취할 때 비교적 쉬우며 반드시 가축등을 도살하지 않아도 된다. 셀레늄을 공급한 뒤에 주기적으로 시료를 채취할 수 있으므로 변화추이를 알 수 있게 된다. 작은 분자량의 셀레늄화학종들을 분석하는 것이 필요한데 이는 혈청에는 단백질 뿐 아니라, 여러 셀레늄 화학종들도 많이 함유되어 있기 때문이다. 즉, 무기 셀레늄 4+와 6+, 셀레노 당(selenosugar), 및 셀레노 아미노산들이 존재하므로 이 들을 조사하는 것이 필요하다. 높은 분자량의 셀레늄 화학종들 특히 셀레노 단백질들은 생체에서 셀레늄의 일반적인 농도를 알려주는 지표가 될 수 있으며 질병의 예방지표와 직접관련이 있는 항산화 물질의 농도를 모니터링할 수 있게 된다. 따라서 본 연구에서는 HPLC(High Performance Liquid Chromatography)-ICP/MS(Inductively Coupled Plasma/Mass Spectrometry)를 사용하여 셀레노아미노산이나 셀레노 단백질(GPx와 SelP)을 분리하고 동위원소 회석법으로 정확하게 정량분석할 수 있는 분석적 기술을 개발하고 가축에 적용하여 사료와 생체내의 화학종들의 변화를 알아낼 수 있는 의미 있는 연구를 진행하였다.

## 2. 실험 방법

### 2.1. 기기

사용된 ICP/MS는 팔중극자 반응셀이 장착된 7500ce Model (Agilent, Lake forest, USA)을 사용하였다. HPLC pump는 L-6200A Intelligent pump (Hitachi, Tokyo, Japan)를 사용하였다. 셀레노 단백질 화학종을 분리하기 위한 컬럼은 친화 컬럼(HEP; Heparin Sepharose)을 사용하였고 셀레노아미노산의 분리를 위하여서는 역상 컬럼(Synchronis 300-10 C<sub>8</sub>, 250 × 4.6 mm) 및 음이온 교환컬럼(PRP X-100)을 사용하였으며 후 컬럼

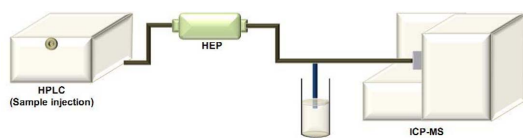


Fig. 1. Schematic diagram of the experimental system.

동위원소 회석법에서 <sup>78</sup>Se 동위원소용액의 주입을 위해 연동펌프 Minipuls 3(Gilson, Bad Camber, Germany)을 사용하였다. HPLC와 ICP/MS의 연결은 비교적 간단하며 직접 연결할 수 있다. 실험에 대한 모식도를 Fig. 1에 나타내었다.

### 2.2. 시약 및 시료

실험에 사용한 모든 용기와 기구는 산세척 후 탈이온수로 세척하고 건조하여 사용하였다. 시료 제조에 사용된 질산은 동우화인켄사에서 구입한 반도체급 시약을 사용하였다. 셀레늄 화학종들은 Sigma-Aldrich (Saint Luis, MO, USA)에서 구입한 sodium selenite (Se<sup>4+</sup>, 99%) sodium selenate decahydrate (Se<sup>6+</sup>, 99.999%), seleno-DL-methionine (SeMet), L-Selenocysteine (SeCys), se-(Methyl)selenocysteine hydrochloride (MeSeCys, 95%)을 탈이온수에 용해하여 사용하였다. 시료 중 셀레늄을 추출하기 위해서 사용된 효소는 *streptomyces griseus* type XIV이며 Lipase는 pancreas type II이고 완충용액은 Sigma-Aldrich에서 구입하였다. 셀레노 단백질 분리에서는 binding buffer(A) 0.05 M ammonium acetate (pH 7)을 사용하였고 elution buffer(B)는 1.5 M ammonium acetate (pH 7)를 사용하였다.

### 2.3. 실험군의 분류

연구에 사용된 모든 실험설계는 다음과 같다. 공시동물은 분만직전 Duroc종 모돈 20두(처리군당 5두)를 대상으로 하였다. 대상모돈을 4 그룹으로 무작위로 나눈 뒤 각 그룹별로 다른 형태의 유무기형태의 셀레늄을 배합후 급여 하였다. 다음 Table 1에 실험군들의 분류에 대한 정보를 요약하여 나타내었다. 셀레늄급원은 유기셀레늄급원은 셀레늄강화효모(Sel-Plex)를 사용하여(제조 및 판매사: Alltech Biotechnology Corp. Inc., Nicholasville, KY, USA) 셀레늄함량기준으로 사료 1 kg 중 0.3 또는 0.6 mg (0.3 mg/kg 및 0.6

Table 1. Design of multiparous lactating sows fed by Se fortified feed

	Voluntary intake			
	Controlled group <sup>1)</sup>	Group I <sup>2)</sup>	Group II <sup>3)</sup>	Group III <sup>4)</sup>
Number	5	5	5	5

<sup>1)</sup>controlled group : No selenium added

<sup>2)</sup>group I : organic selenium 0.3 mg/kg added

<sup>3)</sup>group II : organic selenium 0.6 mg/kg added

<sup>4)</sup>group III : inorganic selenium 0.6 mg/kg added

mg/kg)이 함유하도록 배합하였다. 무기셀레늄급원은 sodium selenite ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ )를 사용하였고 셀레늄함량기준으로 사료 1 kg 중 0.6 mg(0.6 mg/kg)을 함유하도록 배합하였다.

시험사료는 시판되는 포유돈사료(부경양돈협동조합 배합사료공장, 경남 김해소재)에 셀레늄급원을 화학형태 및 수준별로 첨가하여 배합하였다. 혈액채취는 4주간 사료급여후 모든 경정맥을 통해 채혈 후, 원심분리( $3,000 \times g$ , 15 분,  $4^\circ\text{C}$ )하여 혈청(상등액)을 분석시가지  $-70^\circ\text{C}$  냉동고에 보관하였다.

## 2.4. 실험방법

셀레노 아미노산의 분리 및 정량이나 셀레노 단백질의 정량은 기본적으로는 선행연구의 결과<sup>4,5</sup>를 이용하였으나 시료에 맞게 일부 새롭게 변형하였다. 무기 및 셀레노 아미노산의 분리분석은 주로 음이온 교환(Anion Exchange; AE)컬럼을 사용하였고 셀레노 단백질은 HEP 컬럼만을 사용하여 SeIP를 분리하고 나머지 셀레노 단백질인 GPx와 SeAlb을 함께 분리하여 분석하였다. 먼저 binding buffer로 안정화시킨 다음, 시료를 주입한 뒤, GPx + SeAlb을 검출하였다. 다시 elution buffer를 흘려주면 HEP 속의 SeIP가 용리되어 나온다. 셀레노 아미노산의 분석은 효소를 이용하여 단백질을 가수분해한 뒤에 HPLC-ICP/MS로 연구하였다. 가수분해과정은 혈청시료 0.5 g에 6 M urea 0.15 mL와 0.1 M DTT 0.03 mL를 넣은 후 처리하였다. 효소처리와 나머지 과정은 기존의 연구에 따라 사용하였다.

각 시료는 고체상 추출을 사용하여 Br을 제거한 후에 HPLC-ICP/MS를 사용하여 분석하였다. 정량에는  $^{78}\text{Se}$  동위원소를 spike로 사용하여 온라인 방식인 후컬럼 동위원소 희석법을 적용하였다.

## 3. 실험결과 및 고찰

### 3.1. 돈혈청에서의 셀레노 아미노산 분리 및 정량

돈 혈청에서의 셀레노 아미노산의 분리 및 정량방법은 기존의 선행연구<sup>4</sup>를 기반으로 하여 최적의 조건을 찾았다. 돈혈청은 먼저 효소를 이용하여 가수분해시킨 뒤에 작은 분자량의 셀레늄 화학종들을 분석하였다. 역상(RP) 및 음이온 교환(AE) 크로마토 그래피를 모두 사용한 뒤에 더 효율적인 음이온 교환 컬럼을 사용하여 셀레늄 화학종들을 분리하고 정량하였다.

Fig. 2에 그 결과를 보여주고 있다. Fig. 2(a)에는 먼저  $\text{C}_8$  역상컬럼을 사용하여 분리한 것과 Fig. 2(b)에

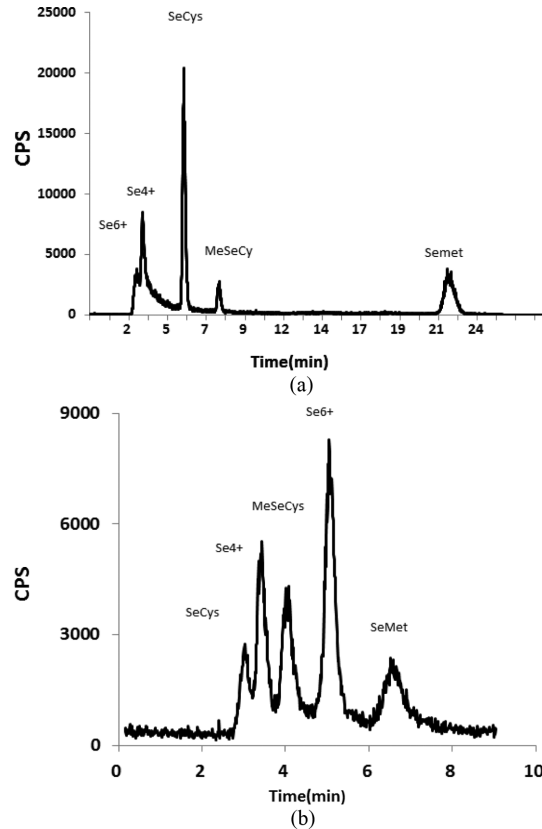


Fig. 2. (a) Separation of 5 standard selenium species with reverse phase chromatography using  $\text{C}_8$  Synchronis column. Inorganic species are not separated well. (b) Separation of 5 standard selenium species with anion exchange chromatography using PRP X-100 column. All is well separated within 8 minutes.

PRP X-100 AE 컬럼을 사용한 것을 보여주고 있다. RP에서는 무기화학종인  $\text{Se}^{4+}$ 와  $\text{Se}^{6+}$ 가 잘 분리되지 않고 있으며 나머지 유기아미노산 화학종들은 잘 분리가 됨을 보여주고 있다. 반대로 AE 컬럼에서는 무기이온인  $\text{Se}^{4+}$ 와  $\text{Se}^{6+}$ 가 잘 분리되고 있으며 유기화학종도 SeCys이 일부  $\text{Se}^{4+}$ 와 겹치는 것을 제외하고는 다 분리가 잘 되고 있음을 보여준다. 따라서 분리능과 분석시간을 동시에 고려하면 좀 더 우수한 AE 컬럼을 선택하였다.

Fig. 3에는 실제시료인 돈혈청을 가수분해한 후에 AE HPLC-ICP/MS로 무기셀레늄과 유기셀레늄 화학종들을 분리하고 검출한 것을 보여주고 있다. 여기에 나타난 것은 하나의 대표적인 것으로서 무기와 유기 여러 화학종들이 골고루 들어있음을 보여준다. 하지만 전체시료를 살펴보면 시료에 따라 다양한 형태의

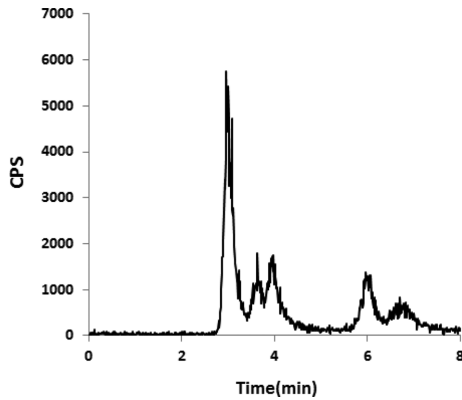


Fig. 3. Separation of selenium species for a serum sample with anion exchange chromatography using PRP X-100 column.

아미노산들이 분포되어 있음을 알아내었다. 어떤 시료들에는 무기화합물인  $\text{Se}^{6+}$ 이나  $\text{Se}^{4+}$ 가 많이 존재하며 어떤 시료에는 Secys 또는 SeMet이 더 많이 발견되었고 이 외에도 약간의 MeSeCys 이 포함된 것으로 보인다.

같은 시료군이라 할지라도 각 개체에 따른 화학종의 분포가 다르므로 여러 개체에 대한 분석 결과를 무기셀레늄( $\text{Se}^{6+}$  및  $\text{Se}^{4+}$ )과 유기셀레늄(SeCys 및 SeMet)으로 나누어 Table 2에 나타내었다. 작은 분자량 셀레늄화합물의 총량은 셀레늄 강화사료를 먹이지 않은 대조군은 28.9 ppb로 나타났으며 강화사료를 먹인 그룹(0.3 mg/kg 유기셀레늄, 0.6 mg/kg 유기셀레늄 및 0.6 mg/kg 무기셀레늄)은 각각 35.6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 42.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  및 29.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 로 나타났다. 특히 유기셀레늄 0.6 mg/kg을 먹인 그룹 II는 대조군에 비하여 뚜렷하게 높은 농도를 보였고 무기셀레늄 0.6 mg/kg 그룹에 비하여 좋은 결과를 보여주고 있다. 통계학적으로 t-test를 적용해 본 결과, 95%의 신뢰수준에서 실험군(그룹 I과 그룹 II)과 통제군은 서로 다른 것으로 나타났다. 무기셀레늄 강화사료를 먹인 그룹 III은 총량이나 각 화학종 모두 대조군에 비해서 별로 증가하지 않았다. 따라서, 유기셀레늄이 무기셀레늄보다는 혈청에서의 낮은 분자량의 셀레늄 화학종의 농도를 증가

하는데 더 효과적으로 보이며 이것은 다른 연구들과 마찬가지로 일관적인 결과이다.

실험군 특히 유기셀레늄 강화사료를 먹인 그룹에 대하여서 셀레늄 화학종들의 증가가 뚜렷하지만 사료의 형태에 따라 어떤 화학종이 더 많이 분포되는지에 대한 부분은 확실하지 않으며 큰 상관관계가 보이지 않았다.

### 3.2. 돈혈청의 셀레노 단백질 정량

본 연구의 초기에는 선행 연구<sup>25</sup>에 따라 친화 컬럼 Heparin과 BLUE를 사용하여 GPx, SeAlb 및 SeIp를 모두 분리하고 분석하였으나 SeAlb에 대한 감도가 좋지 않았다. 따라서 방법을 변형시켜 HEP 컬럼만 사용하고 BLUE는 사용하지 않았다. GPx와 SeAlb은 HEP 컬럼에 머무르지 않고 함께 용리되어 나오고 SeIp만 HEP 컬럼에서 머무르게 되며 용리액을 넣어 주면 SeIp만 따로 분리되어 나오게 된다.

현재 ICP/MS의 기술의 발달로 충돌셀이 개발되었고 동중간섭의 큰 원인인 Ar dimer는  $\text{H}_2$  gas 사용하여 간섭을 제거하게 된다. 이 때 충돌셀 기체인 수소는 시료 중의 Br과 반응 후  $\text{BrH}^+$ 를 형성해  $^{80}\text{Se}$ ,  $^{82}\text{Se}$ 에 간섭을 일으킨다. 따라서 셀레늄 화학종의 정확한 정량을 위해 시료 중 Br을 제거할 필요성이 있으며 연구에서는 SPE cartridge (Bond elut-SAX, 500 mg, 3 mL, Agilent, Lake forest, USA)를 이용한 고체상 추출법으로 시료 중 Br을 제거해 주었다. Fig. 4에서 나타난 바와 같이 SPE를 사용하기 전의 분리그램을 보면 첫 번째 피이크의 후반부에서 매우 높은 잘못된 신호를 보여준다. 이 첫 번째 피이크에서 동위원소  $m/z$  80/78 비(자연 동위원소비=2.1)를 보면 피이크의 앞부분은 일치하지만 뒷부분은 전혀 맞지 않는다. 즉, 앞부분(1.1 min)은 GPx와 SeAlb이 나오고 있으므로 동위원소비가 맞지만 피이크의 후반부(1.9 min 근처)에서는 Br이 함께 용리되어 나와서 BrH를 만들므로  $m/z$  80의 값이 매우 커지게 되고 동위원소비가 전혀 맞지 않게 되는 것이다. 한편 8.4 min 경에 용리되는 SeIp의 경우에는 Br의 간섭이 없고 동위원소비가

Table 2. Comparison of inorganic and selenoaminoacids for Se fortified feed group with controlled group unit; ppb

	Controlled Group	Group I (organic 0.3 mg/kg)	Group II (organic 0.6 mg/kg)	Group III (inorganic 0.6 mg/kg)
Inorganic Se ( $\text{Se}^{6+}+\text{Se}^{4+}$ )	12.8±5.4	12.9±2.7	23.2±5.4	12.6±3.7
Organic Se (SeCys+SeMet)	16.1±1.4	22.7±1.6	19.6±3.1	17.0±5.0
Total	28.9±6.7	35.6±4.3	42.6±2.5	29.5±7.2

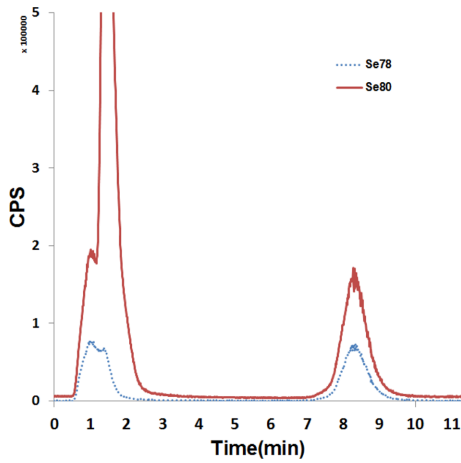


Fig. 4. Separation of selenoproteins with HEP affinity column before using SPE. The ratio of  $m/z80$  to  $m/z78$  do not match for the first peak due to the isobaric interference of BrH.

잘 맞게 된다. SPE를 사용한 경우에서의 그림을 Fig. 5에 나타내었다. Br의 간섭이 완전히 배제되므로 두 피크가 잘 나타나며  $m/z$  80/78의 비도 잘 맞고 있음을 보여준다.

단순한 정성분석이나, 정량에서 검정곡선법을 사용하려면 구태여  $m/z$  80을 사용하지 않고  $m/z$  78을 사용하여도 무방하겠다. 하지만 본 연구에서는 제일 정확정량법인 동위원소 희석법을 사용하고 있다. 즉,  $m/z$  80을 기준으로 삼고  $m/z$  78의 동위원소에 대하여 표준동위원소를 첨가하게 되므로  $m/z$  80을 반드시 모니터링하여야 한다. 여러 그룹의 모돈을 대상으로 혈청내의 셀레노단백질들을 조사하고 그 결과를 다음의 Table 3에 나타내었다.

셀레늄강화사료를 먹인 실험군 모두의 셀레노단백질농도는 대조그룹(86.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )에 비하여 모두 더 높은 값(114.6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 109.4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 114.6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )을 보여주고 있다. 또한 t-test를 적용하여 보면 99% 이상의 신뢰수준으로 실험군이 다르며 실험군간의 차이는 보이지 않았다. 이러한 연구의 결과는 기존의 연구<sup>23</sup>

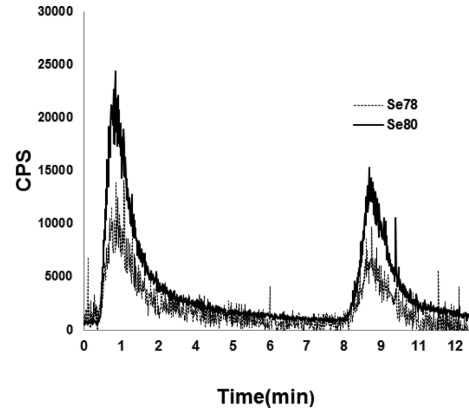


Fig. 5. Separation of selenoproteins with HEP affinity column after using SPE. The ratio of  $m/z80$  to  $m/z78$  for the peaks match well with the natural isotope ratio of 2.1.

와 유사한 결과를 보여준다. 하지만, 앞의 연구에서는 총 셀레늄의 양만 조사되었으나 본 연구에서는 셀레노단백질량과 각 단백질의 량까지 세부적으로 연구가 가능하였다. GPx+SeAlb 및 SelP 모두 대조군보다 셀레늄강화사료를 먹인 그룹에서의 농도가 더 높다. 증가된 정도를 보면 SelP의 경우에 더 현저하게 나타난다. 즉, GPx+SeAlb (25% 정도 증가)에 비하여 SelP는 두 배정도인 50% 증가로서 훨씬 더 큰 증가의 폭을 나타내고 있다. SeAlb은 단백질의 일반적인 지표이지만 SelP는 그렇지 않으며 Meyer<sup>26</sup>는 독일의 전립선 암환자와 신장암의 경우에 SelP의 농도가 비정상적으로 낮음을 보고하였다. 즉, SelP는 어떤 특정한 메커니즘에 따라 심한 차이를 보이며 차후에 더욱 깊은 연구를 진행할 필요가 있는 것으로 보인다.

전반적으로 볼 때에 본 연구에서 조사된 돈혈청의 수는 각 그룹당 5으로서 아직 온전한 결론을 내리기에 좀 부족하다고 할 수 있지만 최소한 대조군과 강화사료를 먹인 그룹에서 셀레노 단백질농도의 차이는 잘 나타내 보이고 있다. 무기강화사료 또는 유기강화사료와의 차이는 셀레노 단백질에서는 보이지 않는

Table 3. Comparison of Selenoproteins for Se fortified feed group with controlled group unit; ppb

	Controlled group	Group I (organic 0.3 mg/kg)	Group II (organic 0.6 mg/kg)	Group III (inorganic 0.6 mg/kg)
GPx+SeAlb	53.4 ± 6.2	64.7 ± 7.6	64.3 ± 2.7	67.5 ± 11.6
SelP	32.7 ± 5.3	49.9 ± 8.8	45.1 ± 10.0	47.1 ± 3.6
Total	86.1 ± 7.8	114.6 ± 3.6	109.4 ± 10.1	114.6 ± 15.2

n=5

다. 무기 및 셀레노 아미노산의 경우에는 유기셀레늄 강화사료가 무기셀레늄 강화사료에 비하여 더 효과적으로 나타났으나 단백질에서는 나타나지 않은 것으로 보아 무기와 유기셀레늄 모두 단백질의 합성에 잘 이용된 것으로 볼 수 있다.

또한 자돈에 대하여서도 셀레노 단백질을 일차적으로 분석해 본 결과, 모돈과 자돈과의 관계에 있어서는 큰 연관성이 나타나지 않았다. 즉 모돈의 포유를 통한 셀레늄의 섭취량에서 그룹간 차이가 크지 않으며 그 이유는 모유에서 셀레늄의 농도가 별 차이가 없는 것인지 아니면 포유자돈의 특성인지 확실하지 않으며 이 연구는 차후에 밝혀져야 할 것이다.

#### 4. 결 론

본 연구에서는 가축의 혈청에서 여러 셀레늄 화학종들(유·무기 셀레늄 및 셀레노 단백질)을 HPLC-ICP/MS를 사용하여 분석할 수 있는 기술을 개발하였다. 셀레늄이 강화된 사료를 모돈에 4주간 먹었을 때 셀레노 단백질들이나 셀레늄 화학종들이 더 생성되고 농도는 각 47%와 33%가 더 증가됨을 알아낼 수 있었다. 셀레노 아미노산의 경우에는 유기셀레늄 강화사료가 더 효과적이었고 셀레노 단백질의 경우에는 두 형태의 사료 모두 효과적이었다. 셀레노 단백질의 경우에는 유·무기 형태의 셀레늄 강화사료 모두 효과적이었고 특히 SeIP가 상대적으로 더 증가함을 알아내었다. 이러한 연구와 정보는 결국 셀레늄과 가축의 질병 및 성장에 관련된 직접적인 정보를 얻을 수 있는 좋은 기초연구가 될 것으로 생각된다. 본 연구에서는 HEP 컬럼을 사용하여 SeIP만을 분리하여 조사하였지만 다음에는 BLUE 컬럼을 사용하여 GPx와 SeAlb을 분리하면 좀 더 세밀한 결과를 얻을 수 있을 것으로 생각하며 다음 연구에서 시행되어야 할 것이다.

#### References

1. S. Palioura, R. L. Sherrer, T. A. Steitz, D. Söll and M. Simonovic, *Science*, **325**, 321-325 (2009).
2. F. Ursini and S. Heim, M. Kiess, *Science*, **285**, 1393-1396 (1999).
3. L. H. Foster and S. Sumar, *Crit Rev Food Sci Nutr.*, **37**(3), 211-228 (1997).
4. H.-Y. Jang, H. Min, J. Lee and Y.-N. Pak, *Analytical Sci. & Technol.*, **26**(3), 182-189 (2013).
5. J. Y. Ahn, H. Kwon and Y. N. Pak, *Analytical Sci. & Technol.*, **27**(2), 357-363 (2014).
6. A. J. Duffield-Lillico, E. H. Slate and M. E. Reid, *J. Natl Cancer Inst.*, **95**(19), 1477-1481 (2003).
7. E. A. Klein, I. M. Thompson and S. M. Lippman, *Prostate Cancer Prostatic Dis.*, **3**(3), 145-151 (2000).
8. S. M. Lippman, E. A. Klein and P. J. Goodman, *JAMA*, **301**(1), 39-51 (2009).
9. Z. Pedrero and Y. Madrid, *Anal. Chim. Acta*, **634**, 135-152 (2009).
10. D. Juresa, J. Darrouze's, N. Kienzl, M. Bueno, F. Pannier, M. Potin-Gautier, A. Kevin and D. Kuehnelt, *J. Anal. At. Spectrom.*, **21**, 684-690 (2006).
11. P. Jitaru, C. Giulio, G. Andrea, C. Paolo and B. Carlo, *Anal Bioanal Chem.*, **391**, 661-669 (2008).
12. M. Roman, P. Jitaru and C. Barbante, *Metallomics*, **6**, 25-54 (2014).
13. F. A. Aborode, A. Raab, S. Foster, E. Lombi, W. Maher, E. M. Kruppa and J. Feldmann, *Metallomics*, **7**(3), Mar 9, *in press*, (2015).
14. J. Bianga, Z. Touat-Hamici, K. Bierla, S. Mounicou, J. Szpunar, L. Chavatte and R. Lobinski, *J Proteomics.*, **108**, 316-24 (2014).
15. K. Bierla, J. Bianga, L. Ouerdane, J. Szpunar and A. Yiannikouris, R. Lobinski, *J. Proteomics.*, **87**, 26-39 (2013).
16. J. Bianga, E. Govasmark and J. Szpunar, *Anal Chem.*, **85**(4), 2037-2043 (2013).
17. D. H. Vanesa, L. F. S. Maria and S. M. Alfredo, *Analytica Chimica Acta*, **538**, 99-105 (2005).
18. T. Celine, R. Ann, D. T. Ludwig, S. Yves-Jacques and P. Luc, *Food Chemistry*, **130**, 767-784 (2012).
19. H. H. Kim, H. Yang and H. Y. Kim, *Korean J. Nutr.*, **44**(2), 112-118 (2011).
20. Y. Park, I.-S. Kim, S. H. Lee, S. H. lee, D. W. Jung, C. J. Park and Y. M. Kim, *J. Life Sci.*, **2**(1), 55-61 (2012).
21. I. H. Jo, S. H. Lee, G. W. Kim, S. Hwangbo, O. K. Han, T. H. Song, T. I. Park and I. B. Choi, *J Korean Soc Grassl Forage Sci.*, **32**(1), 39-48 (2012).
22. Y. D. Jang, H. B. Choi, S. Durosoy, P. Schlegel, B. R. Choi and Y. Y. Kim, *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, **23**(7), 931-936 (2010).
23. J. Travnicek, L. Pisek, I. Herzig, J. Doucha, H. Kvicala, V. Kroupova and H. Rodinova, *Veterinarni Medicina*, **52**,

- 42-48 (2007).
24. O. S. Kwon, J.-W. Hong, B.-J. Min, W.-B. Lee, K.-S. Shon, I.-H. Kim and J.-M. Kim, *J. Korean Soc. Food Sci Nutr.*, **33**(7), 1206-1211 (2004).
25. J. S. Jung, J. H. Lee and Y. N. Pak, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **34**(12), 3817-3824 (2013).
26. H. A. Meyer, T. Endermann, C. Stephan, M. Stoedter, T. Behrends, I. Wolff, K. Jung and L. Schomburg, *PLOS ONE*, issue **10**, e46644 (2012).