

## Proteomic analysis of Korean mothers' human milk at different lactation stages; postpartum 1, 3, and 6 weeks

Jong-Moon Park<sup>1</sup>, Hookeun lee<sup>1</sup>, Seunghyun Song<sup>3</sup>, Won-Ho Hahn<sup>4</sup>, Mijeong Kim<sup>5</sup>,  
Joohyun Lee<sup>5</sup>, and Nam Mi Kang<sup>2</sup> ★

<sup>1</sup>Department of Pharmaceutics, College of Pharmacy, Gachon University, Incheon 21936, Korea

<sup>2</sup>Department of Nursing, Konkuk University, Chungju-si 27478, Korea

<sup>3</sup>Karl-Franzens-Universitaet Graz

<sup>4</sup>Department of Pediatrics, Neonatology, Soon Chun Hyang University, Seoul 04401, Korea

<sup>5</sup>Department of Applied Bioscience, Konkuk University, Seoul 05029, Korea

(Received August 28, 2017; Revised November 29, 2017; Accepted December 5, 2017)

## 출산 후 경과한 날에 따른 한국인 산모의 모유 단백질체 분석

박종문<sup>1</sup> · 이후근<sup>1</sup> · 송승현<sup>3</sup> · 한원호<sup>4</sup> · 김미정<sup>5</sup> · 이주현<sup>5</sup> · 강남미<sup>2</sup> ★

<sup>1</sup>가천대학교 약학대학, <sup>2</sup>건국대학교 간호학과, <sup>3</sup>그라츠카를프란츠 대학교,

<sup>4</sup>순천향대 소아과, <sup>5</sup>건국대학교 응용생물과학과

(2017. 8. 28. 접수, 2017. 11. 29. 수정, 2017. 12. 5. 승인)

**Abstract:** In this study, patterns of proteome expression were monitored and specifically expressed proteins in human milk were detected in collected human milk after 1 week, 3 weeks, and 6 weeks from delivery. A quantitative shotgun proteomic approach was used to identify human milk proteins and reveal their relative expression amounts. For each sample, two independent human milk samples from two mothers were pooled, and then three replicated shotgun proteomic analyses were carried out. Casein, which is a highly abundant protein in human milk, was removed, and then trypsin was treated to produce a digested peptide mixture. The peptides were loaded in the home-made reversed-phase C18 fused-silica capillary column, and then the eluted peptides were analyzed by using a linear ion-trap mass spectrometer. The relative quantitation of proteins was performed by the normalized spectral count method. For each sample, 81-109 non-redundant proteins were identified. The identified proteins consisted of glycoproteins, metabolic enzyme, and chaperon enzymes such as lactoferrin, carboxylic ester hydrolase, and clusterin. The comparative analysis for the 63 proteins, which were reproducibly identified in all three replications, revealed that 25 proteins were statically significant differentially expressed. Among the differentially expressed proteins, Ig lambda-7 chain C region and tenascin drastically decreased with the delivery time.

**요약:** 이 연구는 출산 후 1, 3, 6주가 경과한 산모에서 얻은 모유의 단백질체 발현 양상과 과 발현 단백질을 검출하는 것을 목적으로 하였다. 샷 건 정량 단백질체 분석법을 이용하여 모유 중의 단백질을 동정하였고, 각 수유단계 간에 정량적 비교를 하였다. 각 주의 모유 샘플은 두 명의 산모로부터 얻어진 모유를

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)43-840-3958 Fax : +82-(0)43-840-3958

E-mail : nmkang03@kku.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.

혼합하였고, 각 샘플 마다 3 회 반복 실험을 하였다. Casein은 모유 내에 가장 많이 존재하는 단백질로서 실험의 정확성을 위하여 제거하였고, 트립신을 이용한 절편 화로 모유 단백질을 펩타이드로 변환하였다. 처리된 펩타이드들은 역상 C18 미세관 크로마토그래피 및 이온-트랩 질량분석기를 이용하여 분석하였으며, Spectra Counting으로 단백질의 정량적 비교를 하였다. 각 샘플 당, 80-109 개의 단백질을 중복 제거한 후 동정하였다. 당화 단백질, metabolic enzyme, 및 lactoferrin, Carboxylic ester hydrolase, Clusterin을 포함하는 chaperon 효소들이 주로 검출되었다. 각 반복실험에서 재현성 있게 검출되는 63 개의 단백질에 대한 정량적 비교분석 결과 25 개의 단백질이 통계적으로 유의하게 수유단계에 따라 변화하는 것을 확인할 수 있었고, 특히 Ig lambda-7 chain C region과 Tenascin은 시간에 따라 현저하게 감소하였다. 향후 이와 같은 수유 단계에 따른 모유 내 단백질의 변화가 생리적으로 가지는 의미에 관하여 추가적인 연구가 필요하다 생각된다.

**Key words:** shotgun proteomics, human milk, casein, spectral count, mass spectrometer

## 1 서 론

모유는 신생아에게 가장 좋은 영양 공급원으로 알려져 있으며, 미숙아 및 신생아 환자들에 대한 모유 공급의 중요성에 따라서 모유 은행의 설립 필요성이 대두되고 있다 기증된 모유가 저온살균과 장기 냉동 보관 과정에서 적절한 상태를 유지하는가에 대한 평가는 중요한 문제이며, 모유에 주요 성분 중의 하나인 단백질 양적, 질적 평가는 모아 건강증진의 주요한 지표가 될 수 있다. 단백질학이 발전함에 따라서 모유에 포함된 이로온 작용을 하는 단백질들의 구성성분과 각 성분의 기능, 함유량이 밝혀지고 있다. 모유는 생체 내에서 영유아의 면역체계, 뇌나 위장관등의 발달과 같은 생리학적 물질들을 함유하고 있다. 그 중 단백질은 전체의 0.8~0.9%를 차지하고 있으며, 수유하는 동안 그 함유량이 변화하며, 발달 시기에 맞춰 영유아 건강상태에 다양한 영향을 준다.<sup>1</sup> 이러한 구성성분 중에서 영양소섭취의 촉진 역할을 하는 단백질은 b-casein, a-lactalbumin, lactoferrin, and haptocorrin이 있으며, 항균작용을 하는 단백질은 IgA, lactoferrin, lysozyme, k-casein and lacto peroxidase이며, 이 중 lactoferrin 단백질의 경우는 소화관 발달 촉진에도 도움을 준다<sup>2</sup> 특히 태아의 경우 IgG는 태반을 통해서도 직접 모체로부터 공급받지만, IgA의 경우 영유아는 모유를 통해서만 공급받을 수 있고, 특히 초유에서 그 농도가 높다. 각종 면역 물질을 직간접적으로 공급받음으로써 선천성면역 체계를 완성하고, 동시에 영유아의 장내 미생물 형성에도 중요한 역할을 한다.<sup>1</sup>

모유 단백질은 크게 유청단백질, MFGM (milk fat globule membrane) 단백질, casein으로 나눌 수 있고, casein, lactoalbumin, lactotransferrin, IgA, human serum

albumin, secretory component의 6가지 대표적 과량의 단백질(mg mL<sup>-1</sup> 기준)이 전체 모유 단백질의 90% 이상을 차지한다.<sup>2</sup> 이와 반대로 호르몬과 같은 단백질은 매우 낮은 농도로 존재 하므로, 이들 단백질을 발견하기 위해서는 depletion, ultracentrifugation, isoelectric focusing electrophoresis과 같은 다양한 방법을 적용하여야 한다.<sup>2</sup> 최근 20년간 선형 연구들을 통해서 2천여 개가 넘는 모유 내 단백질이 밝혀졌다.<sup>3</sup> 모유내 대표적으로 과량으로 존재하는 단백질 중 IgA, kappa-casein, lactoferrin, BSSL 등 많은 수가 당화와 관련이 있으며 이들 역시 수유하는 동안 농도가 변한다.<sup>4</sup> 이러한 PTM (post translational modification)은 단백질의 구조와 기능에 크게 영향을 줄 수 있고, 그것들을 분해하는 생화학 반응에도 영향을 줄 수 있다.<sup>4</sup> 최근 본 연구자들은 분만 후 15일, 2개월, 6개월의 모유 샘플을 분석하여 한국인의 모유 내 단백질 구성이 2~6개월 사이에 유의하게 변화하는 것을 발견하였다.<sup>17</sup> 그러나, 잘 알려져 있는 것처럼, 생후 1개월 내에는 모유가 초유에서 이행유로 변화하면서 성분에 있어 큰 변화가 일어나는 것으로 알려져 있다. 이에 본 연구에서는 이 시기의 모유의 변화를 보다 자세히 알아보고자, 분만 후 2개월 내의 시기를 보다 세분화하여 분만 후 1, 3, 6주의 산모에게서 모유를 얻어, 단백체를 분석하였으며, 한국인 산모의 모유에서 단백질 발현 패턴을 제시하고, 수유 시기에 따른 성분의 변화를 비교 분석하였다.

## 2. 실험

### 2.1. 시료 및 전처리

1주, 3주, 6주가 경과된 산모의 모유 시료 중에서 시료 군마다 각각 2 개를 선정하였고, 이들을 합쳐서

총 3 개의 시료를 만들었다. 이 시료들을 다시 3 개의 튜브에 동일한 양을 담아 총 9 개의 시료를 준비하였다. 모유의 대부분을 차지하는 casein을 제거하여 소량으로 존재하는 단백질의 동정을 용이하게 하기 위하여 단백질체 분석 전 시료 내의 casein 단백질을 제거하였다.<sup>5</sup> 카제인 단백질의 제거 하는 실험 방법은 다음과 같다. 시료의 튜브마다  $\text{CaCl}_2$ 를 0.06 M이 되게끔 첨가한 뒤 1시간 동안 4 °C에서 배양 시켰다. 배양 후  $13,000 \times g$ 에서 30 분간 원심분리를 하였으며, 상층 액은 제거하고 원심분리를 한번 더 시행한 뒤 아래층의 액체를 추출하여, 주사기필터(Millipore, Billerica, MA, USA)를 이용하여 필터 하여 유청 단백질을 얻었다. 시료의 4 배의 부피에 해당되는 10 % TCA (Trichloroacetic acid)가 포함된 아세트산에 두 시간 동안 배양을 시켰다. 배양 후 12,000 rpm에서 20분간 원심분리 후 상층 액은 버리고 2 % mercaptomethanol이 들어있는 아세트산으로 씻어 주었다. 아래 생긴 펠렛은 다시 8 M 우레아가 든 100 mM Tris-HCl (ph 8.5) 용액에 재 용해 시켰다.

## 2.2. 단백질 정량 및 소화

Urea에 용해된 단백질은 2D-Protein Quant Kit (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA)를 통해 농도를 측정하였다. 이 중에 300  $\mu\text{g}$ 의 단백질을 5 mM TCEP (Tris (2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride)와 10 mM Iodoacetamide를 이용하여 reduction 및 carbamidomethylation을 하였다. 100 mM Tris-HCl을 이용하여 8 M의 urea를 2 M로 희석하고 trypsin으로 단백질을 digestion 하였다.  $\text{C}_{18}$  (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 이용하여 desalting하였다.

## 2.3. LC-MS/MS 분석 및 조건

시료의 질량을 확인하기 위해 일자형 이온트랩(LTQ ion trap, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 이용해 electrospray 방식으로 이온화하여 분석하였다. 준비된 시료는  $\text{C}_{18}$ 이 들어있는  $365 \mu\text{m}$  o.d.  $\times$   $100 \mu\text{m}$  i.d. fused-silica capillary 컬럼 ( $5 \mu\text{m} \times 15 \text{cm}$ )을 이용하여 역상크로마토그래피 방식으로 분리하였다. 이동상은 (A) water with 0.1 % formic acid와 (B) ACN with 0.1 % formic acid를 사용하였고, 총 분석 시간은 170 분으로 125 분간 B용액을 5 %에서 60 %까지, 125 분부터 140 분까지는 80 %까지 기울기 용리 조건을 주었으며, 140 분부터는 5 % B용액을 흘려 주었다. 컬럼에 흐르는 용액의 유속은 200 nL/min, 컬

럼의 오븐 온도는 40 °C, 질량의 측정 범위는 400~1600 m/z로 설정하였고, CID activation type에서 양이온(+) 모드로 측정하였으며, maximum missed cleavage는 2, dynamic exclusion은 30 초로 설정하여 분석하였다. MS/MS 방식으로 분석된 펩타이드는 uniprot의 human database (<http://www.uniprot.org/>) 2015, 11, 22 version을 토대로 SEQUEST알고리즘을 이용하는 Proteome Discoverer 1.3으로 동정하였다. 펩타이드 동정 시 XCorr scores는 각각 +1가, +2가, +3가인 펩타이드에 대하여 각각 1.5, 2, 2.5 이상으로 filtering하여 validation 하였다. 단백질의 동정에는 target FDR (strict)은 0.01, target FDR (relaxed)은 0.05로 적용하였다. Spectral count 방법으로 각 단백질의 상대적인 발현량을 계산 하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. Casein 제거 후의 모유의 단백질체 분석

모유 시료에 대한 단백질 분석방법의 모식도를 Fig. 1에 나타내었다. Casein 단백질을 제거한 모유의 단백질에서는 최소 80 개의 단백질에서 108개의 단백질이 동정 되었다. 생물학적 반복실험을 통해서 시료마다, 1주 모유 시료는 107 개, 108개, 92 개가 동정 되었고, 3주 모유 시료는 80 개, 81 개, 88 개가 동정되었으며, 6주 모유 시료는 102 개, 80 개, 89 개의 단백질이 동정 되었다.

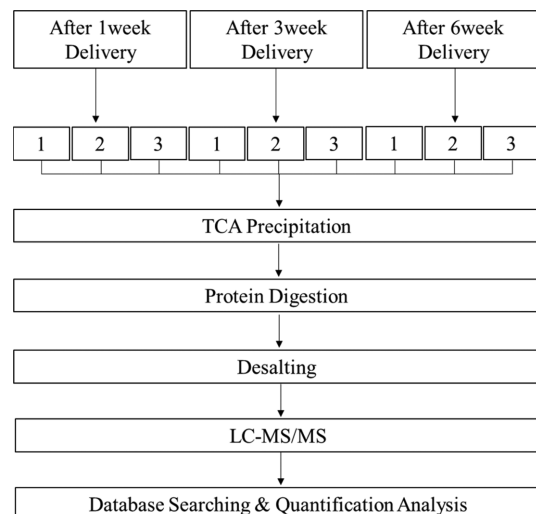


Fig. 1. Schematic diagram of proteomic analysis from human-milk.

3.2. 모유에서 유래된 단백질의 상대 정량 분석

각 단백질 별 NSpC 값은 Human database로부터 동정된 단백질들의 결과는 정규화된(Normalization) spectral count (NSpC)<sup>6-8</sup> 값을 얻기 위해 엑셀로 추출하였다. 각각의 단백질 k에 대해서 NSpC는 다음과 같다.

$$(NSpC)_k = \frac{(SpC/L)_k}{\sum_{i=1}^n (SpC/L)_i}$$

단백질 k에 속하는 펩타이드와 일치하는 모든 ms/ms spectral count (SpC)를 단백질 k의 길이(L)로 나눈 값을 전체 결과 데이터에서 동정된 n개의 단백질의 SpC/L 합계로 나누었다.

위의 식을 이용하여 동정된 각 단백질의 상대적인 발현 량을 계산하였고, 1, 3, 6주차의 시료 각각 3반복에서 재현성있게 동정된 63 개의 단백질에 대하여 분산분석을 통하여 1, 3, 6주에서 통계적으로 유의하게 발현 량의 차이를 보이는 25 개의 단백질을 검출하였다.

3.3. 모유에서 유래된 고 발현 단백질

Table 1은 casein을 제거한 모유의 단백질 중 고 발현된 15 개의 단백질의 리스트이다. 잘 알려진 단백질 중 Lactoferrin은 단백질, 철분, 콜레스테롤의 산화방지제 역할을 하는 항균성의 단백질로 알려져 있으며 또한 transferrin family에 속하는 당 단백질이다. 이외에도 carboxylic ester hydrolase, clusterin과 같은 glycoproteins, metabolic enzyme, chaperon enzyme 등도 동정된 것으로

확인되었다.

3.4. pI and molecular weight

전체적으로 동정된 단백질들의 PI 값 분포와 질량 값의 분포는 Fig. 2에 나타내었다. 동정된 단백질들의 pI 값은 6~7에서 가장 높게 나타났고, 대부분 5~10 사이에서 분포하는 것을 알 수 있었다. 또한, 질량 값의 경우는 10~20 kDa에 가장 많이 분포하고 있으며 대부분 10~70 kDa 사이에 분포하며, 특히적으로 150 kDa 이상의 질량 값을 가지는 단백질들도 확인할 수 있었다.

3.5. 동정된 전체 단백질 GO(gene ontology) 분석

동정된 전체 단백질에 대한 GO분석을 진행하였고, 그 결과를 Table 2에 나타내었다. 통계분석을 통해 얻은 P-value 값에 따라서 나열하였다. 그 중에서는 regulation of mitochondrial membrane permeability가 biological process에서 가장 높게 나타나고, cellular component category에서는 mitochondrion 관련 단백질들이 주로 분포하였다.

3.6. 유전자 기능 범주 별 단백질 발현 패턴 비교

유전자의 기능 카테고리별 단백질 발현 패턴을 Fig. 3에 나타내었다. 총 8개로 구분하였다. 그 중 (A) defense response, (B) immunoglobulin, (C) inflammatory, (G) glycoprotein 에서는 1주에서 6주로 갈수록 감소하

Table 1. The list of the 15 highest expressed proteins in human milk

Accession Number <sup>a)</sup>	Protein name	# AAs <sup>b)</sup>	MW <sup>c)</sup> [kDa]	pI <sup>d)</sup>
Q5EK51	Lactoferrin	711	78.27	8.18
P47710	Alpha-S1-casein	185	21.66	5.38
O75612	Carboxylic ester hydrolase (Fragment)	612	66.32	6.64
E7ER44	Lactotransferrin	708	77.92	8.12
P07498	Kappa-casein	182	20.29	8.92
P05814	Beta-casein	226	25.37	5.78
Q6IBD7	FABP3 protein	133	14.82	6.8
P01833	Polymeric immunoglobulin receptor	764	83.23	5.74
Q96K68	cDNA FLJ14473 fis	494	53.05	6.86
P10909	Clusterin	449	52.46	6.27
P01011	Alpha-1-antichymotrypsin	423	47.62	5.52
Q0KKI6	Immunoglobulin light chain (Fragment)	219	24.01	8.06
L8E7Z2	Alternative protein DLG1	65	7.38	6.51
Q56G89	Serum albumin	609	69.04	6.2
P63261	Actin, cytoplasmic 2	375	41.77	5.48

<sup>a)</sup>UniProt Knowledgebase name, <sup>b)</sup>number of amino acid, <sup>c)</sup>molecule weight, <sup>d)</sup>isoelectric point

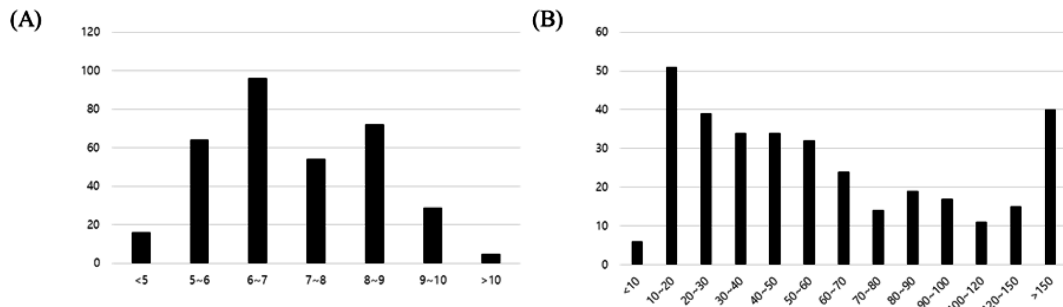


Fig. 2. Distribution of pI value (A) and molecular weight (B) of proteome in casein removed human milk.

Table 2. Enriched GO term of total proteins in casein removed human milk

	GO term	Description	P-value	FDR q-value
Biological process	GO:0046902	regulation of mitochondrial membrane permeability	8.06E-05	2.21E-01
	GO:0090559	regulation of membrane permeability	8.06E-05	1.11E-01
	GO:0009056	catabolic process	2.14E-04	1.96E-01
	GO:0007006	mitochondrial membrane organization	4.16E-04	2.85E-01
	GO:0055074	calcium ion homeostasis	4.31E-04	2.37E-01
	GO:0072507	divalent inorganic cation homeostasis	4.31E-04	1.97E-01
	GO:0021762	substantia nigra development	4.84E-04	1.90E-01
	GO:0048857	neural nucleus development	4.84E-04	1.66E-01
	GO:0044712	single-organism catabolic process	5.59E-04	1.70E-01
	GO:0032496	response to lipopolysaccharide	9.27E-04	2.55E-01
	GO:0002237	response to molecule of bacterial origin	9.27E-04	2.31E-01
Cellular component	GO:0005739	mitochondrion	8.52E-04	3.33E-01

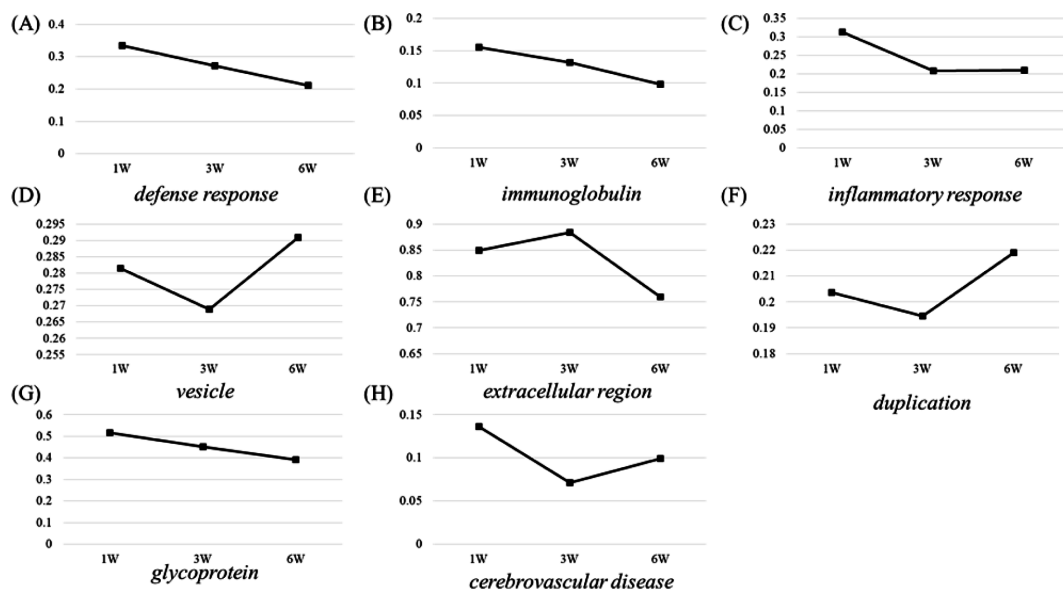


Fig. 3. Composite protein expression patterns of gene function categories.

는 경향을 보였는데, 감소하는 카테고리의 단백질들의 경우 공통적으로 당 단백질들이 포함이 되어 있다. 당 단백질의 경우 글라이칸이 결합된 형태로 병원균의 경쟁적인 억제제의 기능을 하며, 신생아의 감염으로부터 보호 하는 기능을 한다.<sup>9</sup> 이러한 모유에서 당쇄화된 단백질의 경우 질량분석법을 통해서 확인되었다.<sup>10</sup> Immunoglobulin 기능의 단백질 의 경우는 보통 우유와 초유에서 발견되는데, 면역학 적 활동의 중요한 구성성분으로 그 함량이 풍부하다.<sup>11</sup> 또한 산모가 가지고 있는 면역성분들이 모유의 경우 유방상피세포를 통해 이동하고 유방 분비를 통해서 유방 밖으로 옮겨져 신생아에게 전달이 된다.<sup>12</sup> (D) vesicle, (F) duplication, (H) cerebrovascular disease에서는 1주차에서 3주 차로 가면서 감소하다가 3주 차에서 6주 차에는 증가하는 경향을 보였으며, (E) extracellular region 에서는 1주차에서 3주차로 가면서 증가하다가 3주 차에서 6주 차에는 감소하는 경향을 보였다.

3.7. 특이적 발현 량 변화 단백질

통계적 유의성을 가지는 단백질 중에서 특이적인 발현 량 변화가 있는 단백질의 정량 값을 Fig. 4에 정리하였다. Ig lambda-7 chain C region 단백질과 경우는 1주 차에서 3주 차로 시간에 따라서 정량 값이 현저하게 감소하는 경향을 보였으며, 6주 차에는 정량 값이 0으로 줄어든 것을 확인하였다. 앞선 유전자의 기능의 카테고리별 단백질 패턴에서와 같이 Ig lambda-7 chain C region 단백질은 면역 기능에 중요한 역할을 하는 당 단백질 중 하나로 모유에 구성성분으로 알려져 있다.<sup>5,13</sup> tenascin 단백질의 경우도 시간이 경과함에 따라서 급격하게 감소하는 경향을 보였는데, tenascin단백질은 조직 복구에 역할을 하며, 상처치료에 관여하거나 태아의 발생에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며,<sup>14</sup> Sallie R. Permar 논문에서는

tenascin단백질이 HIV에 어떻게 결합하여 신생아들의 감염으로 보호 해주는 지에 대한 연구결과를 보여주었다.<sup>15</sup>

4. 결 론

이 연구의 목적은 출산 후 1, 3, 6주가 경과한 산모에서 얻은 모유의 단백체 발현 패턴과 과 발현 단백질을 검출하는 것으로 주로 단백질 대부분의 함량에 해당하는 casein 단백질을 제거하고 난 후 단백질들을 샷 건 단백체 분석방법 적용하였다. Spectra counting 방식으로 각 주의 모유에서 가장 많은 양에 해당하는 15 개의 단백질을 동정할 수 있었으며, 시료당 최소 80 개에서 109 개의 단백질을 동정하였다. 이 들 단백질 중 GO 분석을 통해 biological process 범주에서 regulation of mitochondrial membrane permeability 관련 단백질과, cellular component category에서 mitochondrion 관련 단백질이 높은 P-value 값을 보여주었으며, 유전자의 기능 범주 별로 단백질 정량 패턴 또한 확인할 수 있었다. 그러나, 본 연구에는 몇 가지 제한 점이 있다. 첫째로, 분석한 모유가 모두 세 명의 산모로부터 채취한 것으로, 결과를 일반화 하거나, 통계적으로 분석한 결과를 신뢰하기에 그 수가 작다. 하지만, 기술적으로 아직은 질량분석을 대규모로 시행하기에는 무리가 있었다. 따라서, 추후에 보다 많은 수의 산모를 대상으로 한 연구를 통하여 보다 정확한 수유기간에 따른 단백질의 변화를 연구하고, 한국인 산모의 대표성 있는 단백질 구성을 조사할 필요가 있다. 둘째로, 산모들의 식이를 조절할 수 없었다는 것이다. 비록, 일부 연구에서는 다른 주장을 하기도 하지만, 현재까지 일반적으로는 대부분의 영양 성분은 식이에 최소한의 영향만을 받는다고 알려져 있다.<sup>16</sup> 하지만, 총 단백질 양이 아닌 단백질체에 미치는 영향은 아직 연구된 바는 없다.

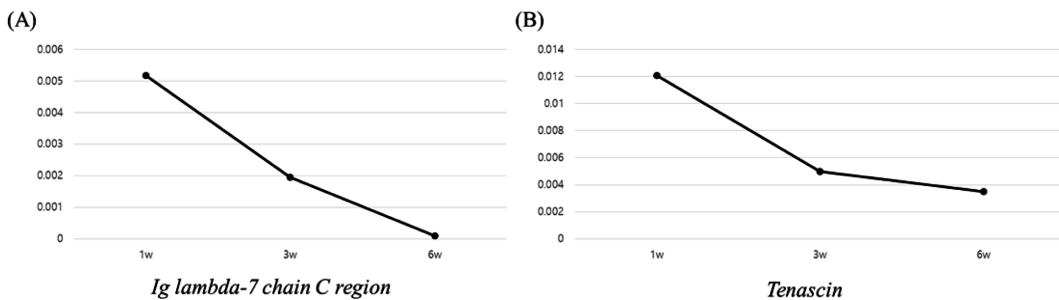


Fig. 4. Composite protein expression patterns.

따라서, 이에 관한 추후 연구도 필요할 것으로 판단된다. 셋째, 비록 영하 80도의 초저온 냉 동고에서 실험이 이루어질 때까지 냉동보관을 하여 단백질의 파괴를 최소화 하려고 노력하였으나, 보관 중 파괴되는 일정 부분의 효과가 본 연구의 결과에 영향을 주었을 수도 있다. 그 중 Ig lambda-7 chain C region 단백질과<sup>5</sup> tenascin 단백질은 시간이 경과함에 따라서 급격하게 감소하는 경향의 결과를 얻어냈다. 시간이 지날수록 모유의 구성성분 들 중 중요한 역할을 하는 성분들이 감소하는 경향을 질량분석을 통해 확인 함으로써 산모의 모유를 보관하는 방법이나 처리하는 방법의 중요성이 대두될 것으로 예상하며, 시간이 경과하더라도 성분들의 변화를 최소화 하여 영양학적으로 균질 하게 보존이 되는 것이 중요하다. 본 결과를 통해서 사견 단백질 분석방법을 모유시료에 적용 가능함을 확인 하였으며, 함량이 높은 casein 단백질을 제거하기 때문에, 상대적으로 분석이 어려웠던 적은 함량의 단백질을 동정 하였다. 또한 본 연구에서 사용된 분석 방법을 이용하여, 다양한 조건의 모유시료에 적용하여, 생물학적 의의를 찾고자 하는 추후연구를 진행 할 수 있을 것으로 기대된다.

### 감사의 글

이 연구는 정부(한국연구재단)의 지원을 받아 수행된 연구임(No. 2015R1A2A1A15056046/2017R1D1A1B03034270).

This work was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea (MSIP) [No2015R1A2A1A15056046; 2017R1D1A1B03034270].

### References

1. R. Jenness, *Semin Perinatol*, **3**(3), 225-39 (1979).
2. A. Mange, V. Bellet, E. Tuailon, P. Van de Perre and J. Solassol, *J. Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **876**(2), 252-256 (2008).
3. K. L. Beck, D. Weber, B. S. Phinney, J. T. Smilowitz, K. Hinde, B. Lonnerdal, I. Korf and D. G. Lemay, *J. Proteome Res.*, **14**(5), 2143-2157 (2015).
4. J. W. Froehlich, E. D. Dodds, M. Barboza, E. L. McJimpsey, R. R. Seipert, J. Francis, H. J. An, S. Freeman, J. B. German and C. B. Lebrilla, *J. Agric. Food Chem*, **58**(10), 6440-6448 (2010).
5. Y. Liao, R. Alvarado, B. Phinney and B. Lonnerdal, *J. Proteome Res*, **10**(8), 3530-3541 (2011).
6. A. C. Paoletti, T. J. Parmely, C. Tomomori-Sato, S. Sato, D. Zhu, R. C. Conaway, J. W. Conaway, L. Florens and M. P. Washburn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**(50), 18928-18933 (2006).
7. B. Zybailov, A. L. Mosley, M. E. Sardu, M. K. Coleman, L. Florens and M. P. Washburn, *J. Proteome Res.*, **5**(9), 2339-2347 (2006).
8. N. M. Griffin, J. Yu, F. Long, P. Oh, S. Shore, Y. Li, J. A. Koziol and J. E. Schnitzer, *Nat. Biotechnol*, **28**(1), 83-89 (2010).
9. D. S. Newburg, G. M. Ruiz-Palacios and A. L. Morrow, *Annu. Rev. Nutr.*, **25**, 37-58 (2005).
10. C. E. Molinari, Y. S. Casadio, B. T. Hartmann, A. Livk, S. Bringans, P. G. Arthur and P. E. Hartmann, *J. Proteome Res*, **11**(3), 1696-1714 (2012).
11. W. L. Hurley and P. K. Theil, *Nutrients*, **3**(4), 442-474 (2011).
12. P. Brandtzaeg, *J. Pediatr*, **156**(2 Suppl), S8-15 (2010).
13. E. A. Lekchnov, S. E. Sedykh, P. S. Dmitrenok, V. N. Buneva, and G. A. Nevinsky, *Int. Immunol.*, **27**(6), 297-306 (2015).
14. R. G. Mansour, L. Stamper, F. Jaeger, E. McGuire, G. Fouda, J. Amos, K. Barbas, T. Ohashi, S. M. Alam, H. Erickson and S. R. Permar, *PLoS One*, **11**(5), e0155261 (2016).
15. G. G. Fouda, F. H. Jaeger, J. D. Amos, C. Ho, E. L. Kunz, K. Anasti, L. W. Stamper, B. E. Liebl, K. H. Barbas, T. Ohashi, M. A. Moseley, H. X. Liao, H. P. Erickson, S. M. Alam and S. R. Permar, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**(45), 18220-18225 (2013).
16. T. Yang, Y. Zhang, Y. Ning, L. You, D. Ma, Y. Zheng, X. Yang, W. Li, J. Wang and P. Wang, *Chin. Med. J. (Engl)*, **127**(9), 1721-1725 (2014).
17. W. H. Hahn, J. H. Song, J. B. Seo, J. E. Lee, J. S. Lee, S. Song and N. M. Kang, *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, **27**(1), 204-210 (2018).