

셀레늄 강화 스피룰리나에서의 낮은 분자량 셀레노 화합물 분석

지영 · 이정석[†] · 한영석^{†,*} · 박용남^{*}
한국교원대학교 화학교육학과
[†](주)네오엔비즈
(접수 2019. 4. 5; 게재확정 2019. 6. 7)

Analysis of Low Molecular Weight of Seleno compounds in Selenium-Fortified Spirulina

Young Ji, Jung Suk Lee[†], Young-Seok Han^{†,*}, and Yong N. Pak^{*}

Department of Chemistry Education, Korea National University of Education, Cheongju 28173, Korea.

*E-mail: pakyn@knu.ac.kr

[†]NeoEnBiz Co. Ltd., Bucheon 14523, Korea. *E-mail: hanulva@neoenbiz.com

(Received April 5, 2019; Accepted June 7, 2019)

요 약. 배양한 셀레늄 강화 스피룰리나를 ICP-MS에서 동위원소희석법을 이용하여 총농도를 정량하였고, HPLC-ICP/MS를 이용하여 낮은 분자량의 셀레늄 화학종들을 각각 분리하고 정량하였다. 셀레노 화합물들은 일차적으로 증류수를 이용하여 추출하였고 이차적으로는 단백질 분해 효소 protease XIV를 이용하여 단백질들을 분해한 뒤에 추출하였다. 배양한 스피룰리나의 셀레늄 총량은 $414.9 \pm 4.0 \text{ mg g}^{-1}$ 으로 나타났고 증류수로 추출하였을 때, 분리한 상등액과 가라앉은 residue는 각각 318.3 mg g^{-1} 과 90.9 mg g^{-1} 으로서 총량의 약 77%와 22%로 분포되어 있었다. 셀레늄 화학종의 분포는 상등액에서는 주로 selenate (222.7 mg g^{-1})가 존재하였고 단백질 가수분해를 시키고 조사한 결과, 유기셀레늄들 SeMet (12.13 mg g^{-1})과 SeCys (15.20 mg g^{-1})이 추가로 나타났다. Residue에서는 무기 셀레늄이 거의 검출되지 않았고 SeCys와 SeMet이 나타났으며 단백질 분해효소를 사용하여 추출한 경우, 더 많은 셀레노 아미노산들, SeCys (9.35 mg g^{-1})과 SeMet (18.23 mg g^{-1}), 및 MeSeCys (1.5 mg g^{-1})이 검출되었다. 무기셀레늄은 주로 스피룰리나의 표면에 흡착된 것으로 보이며 증류수 추출로 이들을 충분히 제거할 수 있었고 결과, residue에서는 대부분 유기셀레늄(99% 이상)만 존재하였다.

주제어: 셀레늄 화학종, 셀레늄강화 스피룰리나, 동위원소희석법, HPLC-ICP/MS

ABSTRACT. Spirulina was cultured in Selenium solution and the total concentration was determined with isotope dilution technique. Low-molecular-weight-Selenium species for the water extract of Spirulina were separated and quantified with HPLC ICP/MS. Water extraction was used first and then protein enzyme (protease XIV) was used to digest and extract for the Se species in both water extract and residue. The total Se was $414.9 \pm 4.0 \mu\text{g g}^{-1}$ and 77% existed in water extract while 22% remained in residue. Se species in supernatant was mostly inorganic selenate ($222.7 \mu\text{g g}^{-1}$). After hydrolysis of protein, SeCys ($15.20 \mu\text{g g}^{-1}$) and SeMet ($12.13 \mu\text{g g}^{-1}$) were found. In residue, SeCys and SeMet were found with little inorganic Se. After protein hydrolysis of residue, more of Selenoamino acids SeCys ($9.35 \mu\text{g g}^{-1}$) and SeMet ($18.23 \mu\text{g g}^{-1}$) in addition to MeSeCys ($1.5 \mu\text{g g}^{-1}$) were found. It is thought that inorganic selenium is mostly adsorbed on the surface of spirulina and can be easily removed by a simple distilled water extraction while most of organo-seleniums are remained in residue.

Key words: Selenium speciation, Selenium-fortified Spirulina, Isotope dilution, HPLC-ICP/MS

서 론

스피룰리나는 단백질의 함량이 매우 높으며 섭취시 콜레스테롤 저하, 면역증진, 항산화 기능의 효과 때문에 최근 건강기능식품으로 많이 이용되고 있다. 스피룰리나를 셀레늄으로 배양하면 셀레늄을 함유한 건강기능식품으로 사용할 수 있으며, 특히 셀레늄으로 배양한 스피룰리

나에 대한 연구와 분석이 활발히 진행되고 있으며^{1,4} 최근 에 리뷰논문⁵에서 자세히 잘 다루고 있다. 그 중 스피룰리나의 주요 단백질 성분인 피코시아닌(Phycocyanin)에 대한 연구가 매우 활발한데, 피코시아닌은 알츠하이머와 파킨슨병의 치료제로 사용되기도 하고⁶, 항암, 항산화, 백혈구 수치 증가 등의 효능을 나타낸다고 보고되고 있다.^{7,8} Huang⁹은 셀레늄 강화 스피룰리나에 대한 연구로서 알코

올로 손상된 간의 기능회복을 보여주었고 그 이유는 항산화효소의 증가임을 보였다.

스피롤리나에는 인체에 필요한 여러 미량성분들이 많이 들어있지만 그 중 셀레늄은 최근에 더욱 관심을 받고 있으며 이에 대한 연구가 필요하다. Chen¹⁰은 셀레늄 강화 스피롤리나에 대해 이온교환과 크기배제 크로마토그래피를 사용하여 셀레늄을 포함하고 있는 피코시아닌을 분리하였으며 이 때의 농도는 $496.5 \mu\text{g g}^{-1}$ 로 나타났다.

셀레늄용액으로 셀레늄을 강화하여 식품으로 사용할 때 주로 채소를 이용하였는데 Pedrero¹¹는 selenite 용액(1 mg L^{-1})을 사용하여 브로콜리를 배양하고 분석한 결과, 셀레늄의 총량이 $27 \pm 3 \mu\text{g g}^{-1}$ 으로 증가하였음을 보고하였다. 또한 USP 효소를 이용하여 가수분해를 한 뒤, 셀레노화합물을 추출하고 음이온 교환(AE, Anion Exchange) 컬럼을 이용하여 분리하였다. ICP-MS (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry)를 사용한 분석 결과, methyl selenocysteine (MeSeCys)이 $3.6 \pm 0.3 \mu\text{g g}^{-1}$, selenite가 $1.4 \pm 0.3 \mu\text{g g}^{-1}$, selenomethionine (SeMet)이 $6.1 \pm 0.2 \mu\text{g g}^{-1}$ 임을 얻었다. Dumont¹²는 셀레늄 강화 마늘을 산분해 전처리하고 ICP-MS로 분석하였는데 Ga를 내부표준물로 사용하여 셀레늄 총량이 $96 \mu\text{g g}^{-1}$ 임을 보고하였다. 증류수 추출액을 RP (C18)-LC-MS로 분석한 결과, Selenocysteine (SeCys), MeSeCys, SeMet, γ -Glu-MeSeCys의 순서로 분리하였고 각 구성분포는 6.0%, 28.8%, 15.5%, 및 49.7% 임을 알아내었다. Ge¹³는 셀레늄 강화 양파를 연구하여 셀레늄 총량이 $100 \mu\text{g g}^{-1}$ 임을 알아내었다. 염산 0.2 M이 포함된 10% 메탄올로 추출하고 AE-LC-ICP-MS로 셀레노 화합물을 SeCys, MeSeCys, selenite 순서로 분리하고 검출하였다. 원¹⁴은 최근 셀레늄이 강화된 콩나물을 재배하고 셀레늄의 화학종을 조사하여 발표한 바 있다.

현대의 분석 연구에서는 단순히 총량을 알아내는 것을 넘어서 각 화학종별로 농도를 알아내는 것은 중요하다. 그 이유는 다양한 형태의 셀레늄은 각각 체내에서 섭취되는 정도 그리고 수행하는 역할과 독성의 정도가 다르기 때문에 섭취하기 전에 유기 셀레늄인지 무기 셀레늄인지 확인할 필요가 있다.^{15,16} 즉, 셀레늄으로 배양한 스피롤리나를 식품으로 사용하여 섭취하기 전에 세포 속에 무기 셀레늄과 유기 셀레늄이 어떤 형태로 어느 농도만큼 분포되어 있는지 알아야 한다. 독성이 있는 무기 셀레늄의 경우에는 이를 분리하여 제거해야만 비로소 좀더 안전하게 섭취할 수 있을 것이다. 결국 총량이 아닌 각 셀레늄의 화학종에 대한 정확한 정보가 있어야 스피롤리나를 식품으로 가공할 수 있을 것이다.¹⁷ 나아가서는 추출과정에서의 화학종 분포변화를 알아냄으로써 독성이 강한 무기 셀레늄을 제거하고 통제하는 방법을 개발하고 이를 이용하여 안전한

식품으로 개발하여 사용할 수 있게 될 것이다.

따라서 셀레늄 화학종 연구는 반드시 필요하며 특히 본 연구에서 시행하는 HPLC-ICP/MS를 이용한 효율적인 분리와 동위원소 희석법을 적용한 정확한 정량분석연구는 그 의미가 매우 크다고 할 수 있다.

실 험

시약

연구에 사용된 sodium selenite (Se IV, 99%), sodium selenate decahydrate (Se VI, 99.999%) DL-SeMet, L-SeCys, MeSeCys는 모두 Sigma-Aldrich (Yongin, South Korea)에서 구입하였다. 스피롤리나를 분해하기 위한 효소인 streptomyces griseous type XIV, phosphate buffer solution, 및 sodium hydroxide는 모두 Sigma-Aldrich에서 구입하였고 HPLC 이동상으로는 ammonium acetate ($\geq 99.99\%$, trace metals basis)를 사용하였다. 충돌기체인 H₂ (99.8 atom, %)는 삼성산소 (Cheongju, South Korea)에서 구입하였다.

시료

셀레늄이 강화된 스피롤리나(Arthrospira platensis)는 (주)네오엔비즈(Bucheon, South Korea)에서 셀레늄 표준용액(Na_2SeO_4)으로 배양한 후, 건조시켜 분쇄시킨 분말 시료를 제공받았다. 자세한 배양 조건은 Table 1에 나타내었다.

HPLC 조건

HPLC column으로는 anion exchange column을 사용하여 셀레노 화학종 표준시료 Se(IV), Se(VI), SeMet, SeCys, MeSeCys를 분리할 수 있는 최적 조건을 찾았다. 실험을 시작하기 전 이동상 0.1 M ammonium acetate (pH=5.20)를 0.7 mL min^{-1} 으로 충분히 흘려주어 바탕이 안정화 되었을 때 실험을 시작하였다. HPLC 에 대한 실험 조건은 다음의 Table 2에 나타내었다.

Table 1. The condition used for spirulina incubation

Incubation form	Non-exchangeable water incubation
Light dose	White light $200 \pm 20 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$
Light cycle	24(Light) : 0(Dark)
Incubation temperature	$30 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$
Incubation vessel	15 L each in plastic round water tank
Incubation term	11~12 day
Se concentration	150 mg L^{-1}
Selenium	Na_2SeO_4
Administration method	At a flow rate of 0.30 to 0.40 mL min^{-1} for about 36 hours

Table 2. The experimental condition for spirulina incubation

Column	Hamilton PRP X-100 column (5 μ m, 4.6 \times 250 mm)
Injection volume	100 μ L
Flow rate	0.7 mL min ⁻¹
Mobile phase	M Ammonium Acetate (\geq 99.99%) pH 5.20

마이크로파 산 분해

셀레늄의 총량을 분석하기 위하여 먼저 시료를 산분해하였다. 건조시킨 스피롤리나 시료 약 0.1 g을 테플론 비커에 넣고 셀레늄 동위원소 스파이크 용액과 31% H₂O₂ 약 1 mL, 그리고 70% HNO₃ 약 9 mL를 첨가하여 180 °C에서 30분 동안 분해하였다.

분해가 완료된 시료 용액은 0.45 μ m syringe filter로 filtering하였다.

상등액과 침전물에서의 추출과정

상등액과 residue 각각에서의 총 셀레늄을 분석하기 위해 50 mL conical tube에 스피롤리나 시료 0.1 g, 증류수 10 g을 넣어주고 37 °C에서 5분 동안 흔들어 주었다. 5분 후 4000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 상등액과 가라앉은 스피롤리나의 침전물을 분리하였다(Fig. 1-A). 분리한 상등액과 침전물은 총량의 경우에는 동위원소를 가한뒤에 마이크로파 산분해과정을 거쳐 분석하였다(B-1, C-1). 화학종 연구를 위하여서는 초음파추출을 하거나 효소를 이용한 단백질의 분해 후에 분석하였다.

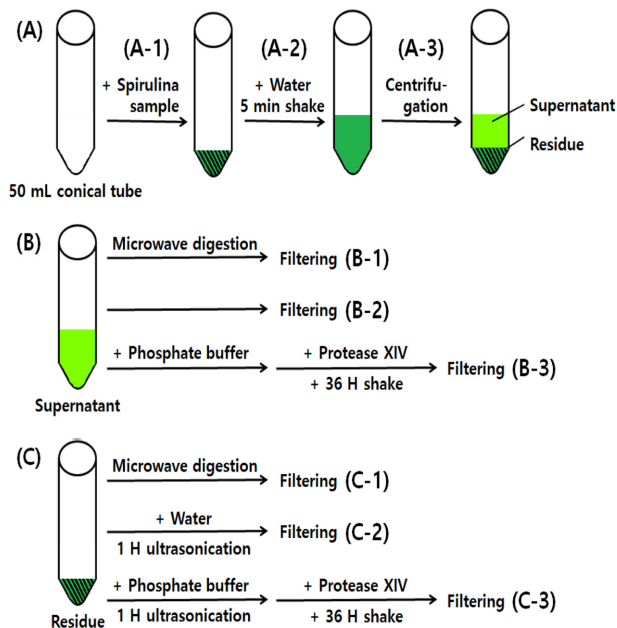


Figure 1. Pre-treatment procedure of spirulina sample. (A) water extraction, (B) pre-treatment of supernatant, (C) pre-treatment of residue.

화학종 분석을 위한 증류수 및 효소분해추출

증류수로 씻은 후((A)단계), 상등액을 0.45 μ m syringe filter로 filtering 하고 직접 화학종 분석에 사용하였다(B-2). Residue는 다시 증류수 10 g을 넣어준 후 초음파 분쇄기로(QsonicaCL-334, K-corporation, Suwon, Korea) 1시간 동안 분쇄(pulse on 30초, pulse off 5초 반복)해준 후 filtering하여 분석하였다(C-2).

효소분해의 경우에는 (A) 단계를 거친 상등액에 0.1 M 인산완충용액 10 g과 protease XIV를 0.1 g을 넣어주었다. 37 °C bioshaker에서 36시간 동안 분해시킨 뒤 0.45 μ m syringe filter로 filtering하여 사용하였다(B-3). Residue에는 0.05 M 인산완충용액 10 g을 넣고 초음파 분쇄기를 사용하여 1시간 동안 분쇄(pulse on 30초, pulse off 5초 반복)한 후 protease XIV 0.1 g을 넣었다. 37 °C bioshaker에서 36시간 동안 분해한 뒤 0.45 μ m syringe filter로 filtering하였다(C-3). 전체적인 스피롤리나 속 셀레노 화합물 추출 과정을 다음 Fig. 1에 나타내었다.

결과 및 논의

셀레늄 표준물 분리

음이온 교환 컬럼을 사용하여 selenite, selenate, SeCys, SeMet, MeSeCys의 셀레늄 표준물을 잘 분리하고 검출할 수 있었다. 각각의 피크는 표준물 첨가법을 사용하여 그 위치를 확인하였다. 셀레늄 표준물 5개 화학종에 대한 분리결과를 아래 Fig. 2에 나타내었다. Selenate는 뒤에 나타나므로 피크의 모양을 잘 보이게 하기 위하여 농도를 4배 정도 더 넣어주었다.

셀레늄 총량 분석

셀레늄으로 배양한 스피롤리나의 전체 셀레늄 총량은

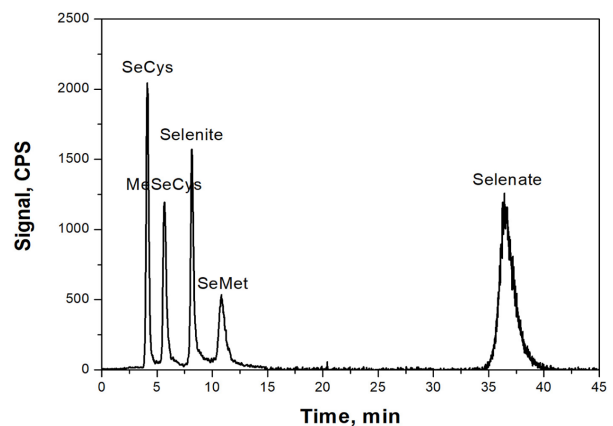


Figure 2. Chromatogram of selenium standard solution mixture (99.6 ng g⁻¹ SeCys, 100 ng g⁻¹ MeSeCys, 98.9 ng g⁻¹ Selenite, 101 ng g⁻¹ SeMet, 400 ng g⁻¹ Selenate).

414.9 ± 4.0 μg g⁻¹ (Average ± SD, n=9)이며, 상등액의 셀레늄 총량은 318.3 ± 5.5 μg g⁻¹, residue의 셀레늄 총량은 90.9 ± 0.5 μg g⁻¹으로 상등액의 셀레늄 농도가 residue보다 3배 이상 높게 나타났다. 즉, 증류수를 사용하여도 총 셀레늄의 75% 이상이 추출되는 것으로 보인다. 물론 어떤 셀레늄이 어느 정도 추출되는지는 화학종 분석을 하여야 할 것이며 그 결과는 뒤에 나타내었다. 상등액의 셀레늄 총량과 residue의 셀레늄 총량을 합한 값(409.2 μg g⁻¹)은 전체 셀레늄 총량(414.9 μg g⁻¹)의 약 98.6%로서 매우 잘 일치하고 있다.

스피롤리나 내의 셀레노 화합물 추출-증류수 추출

셀레늄으로 배양한 스피롤리나를 증류수로 추출한 상등액과 residue 각각에 대한 셀레늄 화학종을 조사하고 그 결과를 다음 Fig. 3과 4에 나타내었다. 상등액에서는 유기 셀레늄은 거의 보이지 않았고 주로 무기 셀레늄인 selenate가 검출되었는데, 이는 일차적으로는 배양한 셀레늄 용액이 selenate이기 때문인 것으로 보인다. 또한, 증류수 추출은 스피롤리나의 표면에서 이루어 진다고 볼 때 겉표면에는 주로 무기 셀레늄이 흡착된 상태로 존재한다고도 볼 수 있다.

작은 분자량의 유기 셀레늄은 거의 나타나지 않은 것으로 보아 짧은 시간의 수용액 추출로는 스피롤리나 내부의 셀레늄 화합물들이 많이 추출되지 않고 다만 외부(주로 표면)의 무기 셀레늄들이 추출되는 것으로 결론 지을 수 있다.

HPLC-ICP/MS에서 후 칼럼 동위원소 희석법으로 정량하여 206.4 ± 13.8 μg g⁻¹ (n=3)를 얻었는데 이 값은 상등액의 셀레늄 총량 318.3 μg g⁻¹의 64.8%이다. 나머지 35.2%는 나타나지 않는 것으로 보아 이들은 분자량이 큰 셀레노 화합물로서 아마 0.45 μm filter에 걸려져서 음이온 교환 칼럼을 사용한 본 연구에서는 검출되지 않은 것으로 추측된다.

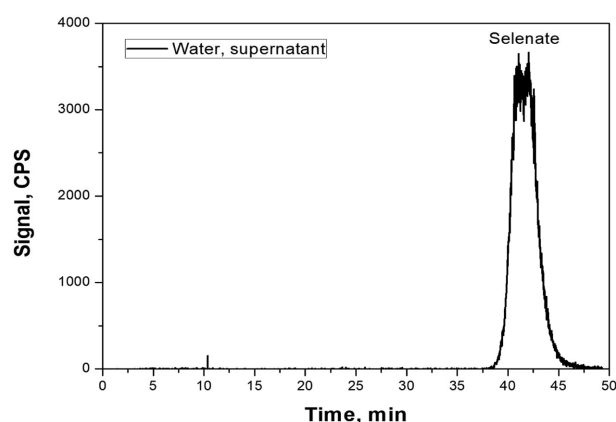


Figure 3. Chromatogram of spirulina with water extraction for supernatant.

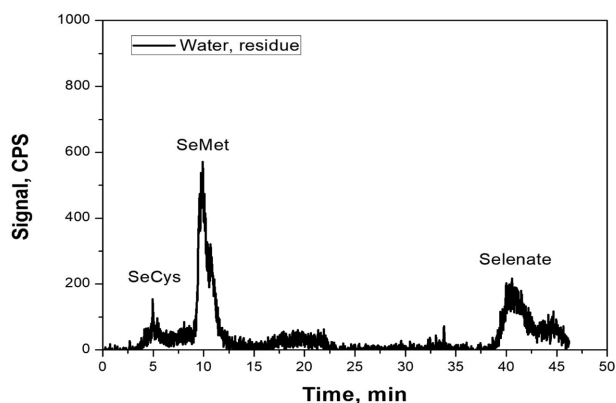


Figure 4. Chromatogram of spirulina with water extraction for residue.

Residue를 다시 마이크로파를 이용하여 추출하고(C-2 과정) 조사해보면 Fig. 4에서처럼 화학종 분포는 상등액과 매우 다르게 나타난다. 유기 셀레노 화합종으로 주로 SeMet과 약간의 SeCys이 나타났으며 무기 화학종으로는 selenate가 약간 검출되었으나 그 농도는 높지 않았다.

이는 residue에는 22% 가량의 유기 셀레늄이 존재하지만, 주로 큰 분자 형태로 존재하여 수용액에는 쉽게 추출되지 않으며 마이크로파를 이용하여도 쉽게 분해되거나 추출되지 않는 것으로 보인다. SeMet을 정량한 결과 5.43 μg g⁻¹으로 나타났으며 residue에서의 셀레늄 총량 90.86 μg g⁻¹과 비교할 때 약 6% 정도로 매우 소량으로 나타난다는 것을 볼 수 있다. 즉, residue에서는 일반적인 방법으로는 쉽게 추출되지 않는 단백질 및 큰 분자형태의 셀레늄 화합물로 많이 존재한다고 보인다.

스피롤리나 내의 셀레노 화합물 추출-효소 추출

따라서 큰 분자형태의 셀레노 화합물을 추출하기 위하여 단백질 분해효소를 사용한 추출을 시도하였다. 이 때 효소 자체에 의한 셀레노 화합물 peak가 나타나는지 확인하였는데 Fig. 5에 효소 바탕 크로마토그램을 나타내었다. 크로마토그램을 보면 protease XIV에 매우 소량의 selenate가 나타나는 것을 확인할 수 있고 enzyme 바탕의 면적만큼 보정해주었다.

Fig. 6에는 단백질 분해효소를 이용하여 셀레늄 단백질을 분해시키고 추출한 상등액(Fig. 6-A)과 residue (Fig. 6-B)에 대한 결과를 나타내었다.

스피롤리나를 증류수로 추출한 상등액에는 selenate 한 가지 화학종만 나타났지만(Fig. 3) 그 상등액을 효소 분해한 크로마토그램 Fig. 6(A)을 보면 무기 셀레노 화합물인 selenate 뿐만 아니라 약간의 유기 셀레노 화합물인 SeCys과 SeMet, 및 매우 소량이지만 MeSeCys이 나타나는 것을

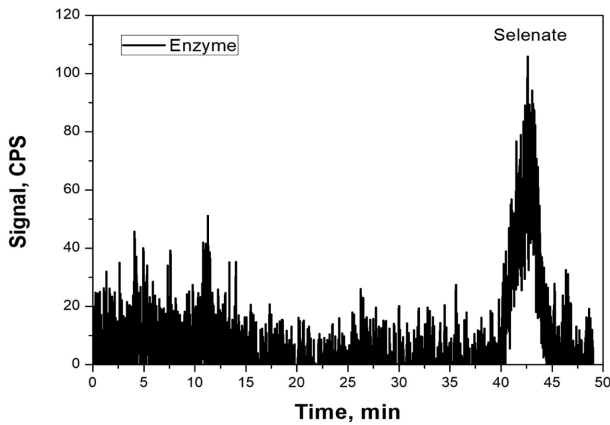


Figure 5. Chromatogram of enzyme blank.

볼 수 있다. 이것은 증류수 추출시 상등액에 비록 셀레늄 단백질이 존재하여도 filtering되었을 때에는 나타나지 않았지만, 단백질을 분해하였을 때에 비로소 나타나는 것으로 보인다. 하지만 residue를 단백질 분해효소로 분해시킨 Fig. 6-(B)의 크로마토그램을 보면 유기 화학종인 SeCys과 SeMet 및 MeSeCys 가 주로 나타나며 무기셀레늄은 거의 나타나고 있지 않다. 결국, 이 결과는 남아있는 residue에는 주로 유기 셀레늄들이 단백질 형태로 존재함을 알려주고 있다. 추출시에, 상등액에는 대부분의 무기 셀레늄과 약간의 단백질 및 유기 셀레늄이 추출되고 있음을 보여 준다.

초음파를 사용한 추출에서도 증류수 추출과 비슷한 결과를 보여주는데 결국, 스피룰리나는 배양액의 무기 셀레늄을 이용하여 체내에 셀레늄 단백질 및 유기물질을 잘 합성하고 있는 것으로 보인다. 또한 배양에 사용된 무기 셀레늄은 주로 스피룰리나 표면에 흡착되어 있고 내부에는 거의 존재하지 않는 것으로 보이며 유기 셀레늄은 수용액으로 일부 추출이 되지만 대부분은 물에 녹아 나오지 않고 남아있는 것으로 보인다.

각 셀레노 화합물들을 후 칼럼 동위원소 회색법을 이용하여 정량하였다. 이 결과를 다음의 Table 3에 나타내었다.

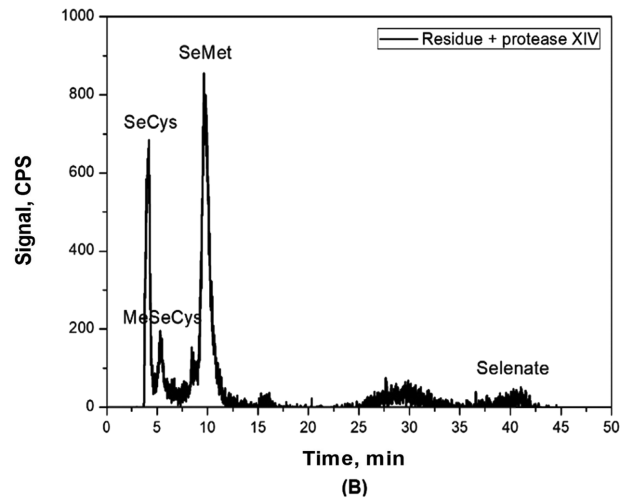
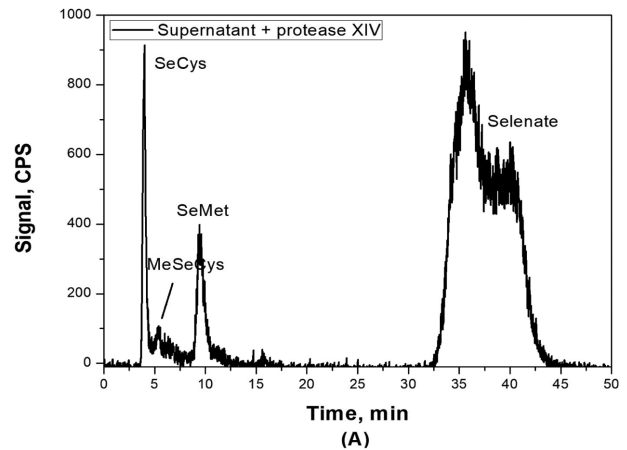


Figure 6. Chromatogram of enzyme decomposition for supernatant (A) and residue (B).

상등액을 살펴보면 무기 selenate가 주 성분으로 농도는 $222.7 \pm 11.1 \mu\text{g g}^{-1}$ (n=3)이고 유기 셀레늄 화합물인 SeCys과 SeMet가 일부 나타났으며 농도는 각각 $15.20 \pm 3.78 \mu\text{g g}^{-1}$ 와 $12.13 \pm 0.84 \mu\text{g g}^{-1}$ 이다. 상등액 전체 셀레늄 총량 $318.3 \pm 5.5 \mu\text{g g}^{-1}$ 에 비교하면 상등액 효소 분해에 의한 셀레노 화합물의 농도가 $250.0 \pm 11.8 \mu\text{g g}^{-1}$ 으로 78.5% 정도이다. 즉,

Table 3. Concentration and percentage of selenium in selenium-enriched Spirulina (unit; $\mu\text{g g}^{-1}$)

	Spirulina (total) 414.9 ± 4.0			
	Supernatant 318.3 ± 5.5 (76.72%)		Residue 90.86 ± 0.53 (21.90%)	
	Water extraction	Enzyme extraction	Water extraction	Enzyme extraction
Selenate	206.4 ± 13.8	222.7 ± 11.1	trace	trace
SeCys	-	15.20 ± 3.78	-	9.35 ± 0.27
SeMet	-	12.13 ± 0.84	5.43	18.23 ± 2.47
MeSeCys	-	-	-	1.5 ± 0.4
Total	206.4 ± 13.8	250.0 ± 11.8	5.43	29.1 ± 2.49

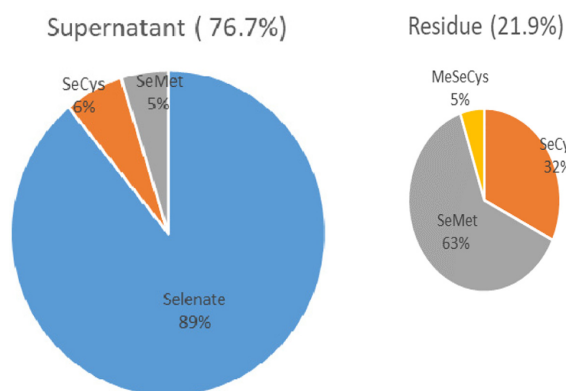


Figure 7. Composition of selenium species for supernatant and residue after enzyme hydrolysis of selenium fortified spirulina.

효소추출의 경우가 단순 증류수 추출의 경우보다 13.7% 더 증가하였지만 아직 약 21% 가량의 분해되지 않은 단백질 또는 다른 화합물이 존재한다고 볼 수 있다.

Residue에 대한 결과를 살펴보면 상등액과는 매우 다르게 무기 셀레늄은 거의 검출되지 않았고 주로 유기화합물들만 검출되었다. SeCys의 농도는 $9.348 \mu\text{g g}^{-1}$, SeMet의 농도는 $18.23 \mu\text{g g}^{-1}$, 그리고 MeSeCys이 $1.5 \mu\text{g g}^{-1}$ 이며 총합은 $29.1 \pm 2.6 \mu\text{g g}^{-1}$ 으로 나타났다. 효소분해시에는 단순 증류수 추출에 비하여 유기 셀레늄 종의 농도가 약 5배 정도 증가하였다. 하지만 residue의 총량인 $90.86 \mu\text{g g}^{-1}$ 에 비교하면 약 32% 정도의 셀레늄만 나타나고 있다. 나머지 약 68% 가량은 상등액의 경우와 마찬가지로 셀레늄 단백질이 모두 분해되지 않았거나 또는 쉽게 추출되지 않는 다른 형태의 셀레늄 화합물로 존재하는 것으로 보인다.

셀레늄 화합물들의 분포와 구성비%를 Fig. 7에 간단히 나타내었다. 전체 셀레늄 중에서 상등액에는 76.7%, residue에는 21.9%가 분포되어 있다. 상등액에는 무기 selenate가 대부분으로 89.0%, 유기 셀레노 화합물은 SeCys와 SeMet의 각각 6%와 5%로 구성되어 있다. Residue의 경우에는 무기 셀레늄 종은 거의 없으며 유기 셀레늄 종인 SeMet, SeCys, 및 MeSeCys이 63%, 32%, 및 5%를 차지하고 있다.

Residue의 경우에 상등액에 비하여 효소분해된 양이 낮은 것은 상등액은 주로 무기 셀레늄 형태이므로 쉽게 추출, 검출되는 반면에 residue의 경우에는 주로 복잡한 유기물 형태이므로 완전한 분해를 시키지 않으면 제대로 검출할 수 없기 때문으로 생각된다. 결국, 세포 속 셀레늄은 매우 다양한 형태로 존재하기 때문에^{17,18} 현재 사용한 protease 한 가지 효소로는 전부 분해할 수 없는 것으로 보인다.

셀레늄의 하루 최대 섭취 권장량은 $400 \mu\text{g}$ 미만으로 셀레늄으로 배양한 스피롤리나를 1.0g 만 섭취하여도 이미 하루 권장량을 뛰어넘는 범위이다. 무엇보다 독성이 있는

무기 셀레늄을 많이 섭취하게 되기 때문에 배양한 스피롤리나를 그냥 섭취하는 것은 적절치 않을 수 있으며 생산단계에서 무기 셀레늄을 적절히 제거하여야 할 것이다. 수용액으로 추출하거나 추가로 초음파 추출을 하면 효과적으로 대부분의 무기 셀레늄은 제거가 된다. Residue만 따로 분리하여 섭취한다면 무기 셀레늄을 제거할 수 있고 독성과 부작용이 작은 유기 셀레늄만을 효과적으로 섭취할 수 있게 될 것이다.

결론

건강기능식품으로 유용한 셀레늄 배양 스피롤리나 시료 속 셀레늄의 총량과 셀레늄 화합물들을 조사하였다. 동위원소 희석법과 후 컬럼 동위원소 희석법으로 정량하여 각 화학종의 농도와 분포비율을 알아내었다.

단순 증류수 추출에서보다 Protease XIV를 이용한 추출 방법이 더 효과적으로 셀레노 화합물들을 수용액으로 추출하였으며 상등액에는 주로 무기 셀레노 화합물, residue에는 대부분 유기 셀레노 화합물이 존재하였고, 무기는 주로 selenate형태이며 유기는 SeMet, SeCys, 및 MeSeCys이 존재함을 확인하였다. 독성이 있는 무기 셀레늄을 제거하기 위해서는 추출이 필요하며 추출후에는 무기 셀레늄을 거의 다 제거할 수 있었다. 남은 residue에서는 독성이 적고 인체의 활용도가 높은 유기 셀레늄 화합물들만 존재하며 그 농도는 91 ppm 정도로 밝혀졌다.

본 연구를 통하여 건강보조식품인 셀레늄 강화 스피롤리나는 유용하게 활용할 수 있는 방법이 확립될 수 있을 것으로 보인다.

Acknowledgments. 이 논문은 한국교원대학교 2018 학년도 연구년 교수 학술 지원비 지원을 받아 수행한 연구의 결과임.

REFERENCES

- Mosulishvili, L. M.; Kirkesali, Y. I.; Belokobylsky, A. I.; Khizanishvili, A. I.; Frontasyeva, M. V.; Gundorina, S. F.; Oprea, C. D. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **2002**, 252, 15.
- Chen, T. F.; Chui, X. F.; Yang, F.; Zheng, W. J.; Bai, Y. *Food Ferment Ind.* **2005**, 31, 48.
- Chen, T.; Zheng, W.; Yang, F.; Bai, Y.; Wong, Y.-S. *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, 39, 103.
- Nehera, B. D.; Azcarate, S. M.; Camina, J. M.; Savio, M. *Food Chem.* **2018**, 257, 295.
- Soni, R. A.; Sudhakar, K.; Rana, R. S. *Trends Food Sci. Technol.* **2017**, 69, 157.
- Rimbau, V.; Camins, A.; Pubill, D.; Sureda, F. X.; Romay,

- C.; González, R.; Jimenez, A.; Escubedo, E.; Camarasa, J.; Pallàs, M. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2001**, *364*, 96.
7. Reddy, M. C.; Subhashini, J.; Mahipal, S. V. K.; Bhat, V. B.; Reddy, P. S.; Kiranmai, G.; Madyastha, K. M.; Reddanna, P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *304*, 385.
8. Morcos, N. C.; Berns, M.; Henry, W. L. *Lasers Surg. Med.* **1988**, *8*, 10.
9. Fu, X.; Zhong, Z.; Hu, F.; Zhang, Y.; Li, C.; Yan, P.; Feng, L.; Shen, J.; Huang, B. *Food Funct.* **2018**, *9*, 3155.
10. Chen, T.; Wong, Y.-S.; Zheng, W. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 2424.
11. Pedrero, Z.; Elvira, D.; Cámara, C.; Madrid, Y. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *596*, 251.
12. Dumont, E.; Ogra, Y.; Vanhaecke, F.; Suzuki, K. T.; Cornelis, R. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *384*, 1196.
13. Ge, H.; Cai, X.-J.; Tyson, J. F.; Uden, P. C.; Denoyer, E. R.; Block, E. *Anal. Commun.* **1996**, *33*, 279.
14. Won, E.; Pak, Y. *J. Korean Chem. Soc.* **2018**, *62*, 319.
15. Xia, Y.; Ha, P.; Hill, K.; Butler, J.; Whanger, P. *J. Trace Elem. Exp. Med.* **2000**, *13*, 333.
16. Butler, J. A.; Thomson, C. D.; Whanger, P. D.; Robinson, M. F. *Am. J. Clin. Nutr.* **1991**, *53*, 748.
17. Cases, J.; Vacchina, V.; Napolitano, A.; Caporiccio, B.; Besançon, P.; Lobinski, R.; Rouanet, J.-M. *J. Nutr.* **2001**, *131*, 2343.
18. Cases, J.; Wysocka, I. A.; Caporiccio, B.; Jouy, N.; Besançon, P.; Szpunar, J.; Rouanet, J.-M. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 3867.
-