Journal of the Korean Chemical Society
2018, *Vol. 62, No. 4*
Printed in the Republic of Korea
https://doi.org/10.5012/jkcs.2018.62.4.319

단신 (Notes)

셀레늄 강화 콩나물에 대한 셀레늄 화학종 연구

원은혜 · 박용남*
한국교원대학교 화학교육학과
(접수 2018. 2. 21; 게재확정 2018. 5. 23)

Study of Selenium Speciation for Selenium-Enriched Soy Bean Sprout

Eunhye Won and Yongnam Pak*
*Department of Chemistry Education, Korea National University of Education, Taesungtapyun 250, Chengju 28173, Korea. *E-mail: pakyn@knue.ac.kr*
(Received February 21, 2018; Accepted May 23, 2018)

Key words: Selenium, Speciation, HPLC-ICP/MS, Bean Sprout

셀레늄은 인체나 생체에 필요한 필수미량물질로 글루타티온 과산화분해효소(Glutathione Peroxidase; GSH-Px) 같은 항산화 작용에 관여하는 효소의 생성이나 활성에 관계가 있다. 결핍시에는 GSH-Px의 활성을 떨어뜨려서 대사과정 중에 발생하는 산화물질인 과산화수소를 효과적으로 제거하지 못하게 되어 세포의 기능장애 또는 세포의 파괴를 유발한다.[1-2] 이에 따라 셀레늄의 항산화작용 및 노화에 관한 연구들이 많이 보고되었으며 최근에는 셀레늄의 항암작용에 대한 연구들이 보고되거나 진행되고 있다.[3–6]

적절한 량의 셀레늄을 매일 섭취하는 것은 우리 인체의 건강유지에 중요하다. 우리나라를 포함한 세계 전반적으로 볼 때에 셀레늄의 섭취량은 부족하지는 않지만 일부 특정 지역이나 노인층 및 건강위험군의 사람들에게는 특별히 더 섭취할 필요성이 있다. 이에 따라 셀레늄을 비타민에 첨가하여 섭취하거나 셀레늄을 강화시킨 식품을 섭취한다. 이러한 셀레늄 강화식품이나 건강보조제를 사용할 때에는 셀레늄의 농도를 정확히 아는 것은 매우 중요한데 이는 셀레늄에는 독성이 있어 조금만 과량 섭취하여도 셀레늄 중독증인 selenosis증상이 나타나기 때문이다.

셀레늄은 다양한 여러 형태로 존재가 가능하며 무기셀레늄 이온으로 selenide(-2), selenite(+4), selenate(+6) 들이 있고 유기 셀레늄은 작은 분자량의 화합물로는 당종류나 아미노산 종류가 있을 수 있으며 큰 분자로서는 셀레늄을 포함하고 있는 효소와 단백질들이 있다. 각 화학종은 서로 다른 화학적, 생화학적 성질을 가지고 있으며 인체나 생체에서 다른 활성도를 보인다.[7] 어떠한 형태로 셀레늄을 섭취하는가에 따라 인체에 유익하거나 독성을 가질 수 있고 또한 활성도나 생체 활성도가 달라질 수 있으므로 섭취하고자 하는 셀레늄식품에 대한 정확한 화학종의 정보가 필요하게 된다.

셀레늄을 보조로 섭취하는 방법은 우선 무기셀레늄(selenate 또는 selenite)을 생각할 수 있으나 독성이 있고 생체활성도가 낮으며 유기셀레늄이 지속성 및 생체활성도면에서 더 유리하다. 무기셀레늄으로 재배한 곡류나 채소에서는 일부 유기셀레늄인 셀레노 메타이오닌등이 형성되므로 셀레늄으로 강화된 곡류나 채소를 섭취하는 것이 더 유리하다고 볼 수 있다.[8] 물론 이러한 셀레늄 강화식품들에서 무기셀레늄이 모두 유기셀레늄으로 전환 되었다고 볼 수 없으므로 얼마나 어떤 형태로 전환되었는지에 대한 연구들이 필요할 것이다.

셀레늄이 강화된 식품으로는 셀레늄이 강화된 사료를 먹인 육류가 있지만 대체로 채소를 많이 사용한다. 그 이유중 하나는 육류에서는 간접적인 셀레늄의 강화효과가 적고 가공에 시간이 많이 걸리기 때문이다. 셀레늄이 강화된 채소 또는 곡물은 재배기간이 짧고 간단하며 경비가 적게들므로 많은 연구들이 진행되었는데 대표적으로 셀레늄이 강화된 브로컬리, 아스파라거스, 양파등의 채소들이 재배 및 시판되고 있다.[9–11] 또한 이러한 셀레늄 강화 채소에서 기인한 생체내 대사물질(메틸화된 셀레늄 등)과 이들의 항암 효과에 대한 연구가 이루어지고 있다.[12,13]

본 연구에서는 콩나물을 선택하여 셀레늄 강화 식품으로의 가능성을 조사하였는데 이 는 생육기간이 다른 식품에 비하여 짧고 재배가 간단하며 계절과 장소에 구애받지 않는 특성을 가지고 있는 국민건강식품이기 때문이다. 재배한 콩나물에 대한 셀레늄의 총량을 유도결합 플

라즈마 질량분석법(ICP/MS, inductively coupled plasma/mass spectrometry)을 이용하여 콩나물 내 존재하는 셀레늄의 총량을 분석하였다. 동시에 셀레늄에 대한 화학종의 정보를 아는 것이 중요하므로 이온쌍 크로마토 그라피(HPLC, high performance liquid chromatography)를 이용하여 화학종들을 분리하고 ICP/MS를 연결하여 이 셀레늄 화학종들을 민감하게 분리 분석을 하였다. 본 연구에서 사용된 분석기법과 화학종 정보는 앞으로 셀레늄 강화 콩나물뿐 아니라, 여러 셀레늄 강화식품에 대한 분석을 용이하게 하여 국민건강의 기초자료에 활용될 수 있을 것이다.

결과 및 고찰

콩나물의 물리적 변화

먼저 콩나물을 여러 농도의 무기셀레늄 수용액(Na_2SeO_3)에서 재배한 뒤 이들의 성장을 재배기간과 재배용액의 농도에 따라 조사하였다. 콩나물은 1-10 ppm 셀레늄 수용액에서 일주일간 재배한 뒤에 각 각의 무게와 길이를 조사하였는데 이 들은 서로 비슷한 경향을 보여주므로 길이에 대한 결과만을 *Fig.* 1에 나타내었다.

대체로 셀레늄 재배용액이 묽을 때에는 큰 영향을 받지 않으나 5 ppm 부터는 성장에 지장을 받으며 시간이 지날수록 더욱 큰 영향을 받음을 알 수 있다. 콩나물 재배가 완료되었을 때에 재배용액의 농도에 따른 콩나물의 성장을 조사하여 *Table* 1과 *Fig.* 2에 나타내었다. 최종성장이 완료된 콩나물의 길이와 무게는 셀레늄 재배용액의 농도에 따라 감소하는 것으로 보아 콩나물의 성장은 방해되며, 특히 5 ppm 이상의 용액에서는 현저하게 저해됨을 보여준다. Arscott와 Goldman[14]은 녹두와 브로컬리 및 양파

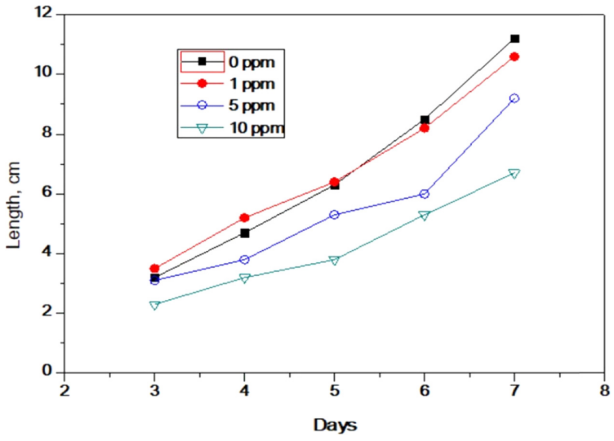


***Figure* 1.** The length of soybean sprouts with time at different Se concentrations of cultivating solution.

***Table* 1.** The growth rate (average±standard deviation) of soybean sprouts at different Se solution concentrations

Conc., ppm	weight, g	length, cm
0	3.16±0.24	12.02±1.20
1	3.25±0.42	10.42±1.63
3	3.19±0.30	9.84±1.44
5	2.63±0.19	9.20±1.32
7	2.67±0.53	7.26±1.53
10	2.73±0.29	6.76±1.70

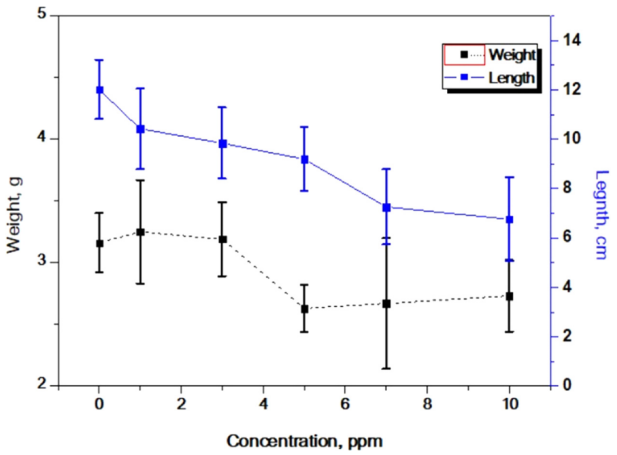


***Figure* 2.** The growth of soy bean sprout with different concentrations of cultivating Se solution.

에 대하여 실험한 결과, 정도의 차이는 있지만 낮은 농도(127 μM)와 달리 높은 농도(1270 μM)에서 모두 성장저하가 일어남을 보고하였다. 결론적으로 셀레늄의 농도가 높은 수용액에서 재배된 콩나물은 다른 연구에서 언급한 것과 같이 생장이 둔화함을 알 수 있으며 콩나물의 재배에는 5 ppm 이하의 적절한 농도가 필요한 것으로 판단된다.

콩나물에 함유된 셀레늄의 함량 분석

검정곡선법을 사용하여 콩나물에 함유된 셀레늄의 총량을 조사하였다. 표준용액을 사용하여 여러 셀레늄 동위원소들에 대한 검정곡선을 작성한 결과, *m/z* 78과 82가 가장 좋은 직진성을 보여주었고 82를 사용하여 다음과 같은 검정곡선으로(*Fig.* 3)으로 정량하였다.

콩나물에서의 셀레늄의 농도를 조사해 보면 별도의 셀레늄을 첨가하지 않은 일반콩나물은 약 11.8 ppb의 셀레늄을 포함하고 있다. 셀레늄 재배수용액 농도에 따른 콩나물에서의 셀레늄 함량을 분석한 결과를 *Table* 2와 *Fig.* 4에 나타내었다. 셀레늄 재배 수용액의 농도가 증가함에 따라 콩나물에 존재하는 셀레늄의 함량도 증가하지만, 7 ppm 이상부터는 콩나물이 흡수하는 속도와 양이 일정하거나 오히려 감소함을 보여준다.

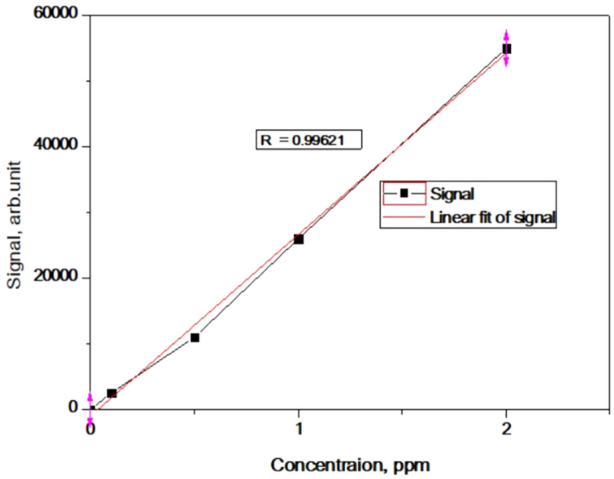


***Figure* 3.** The calibration curve of selenium (^{82}Se).

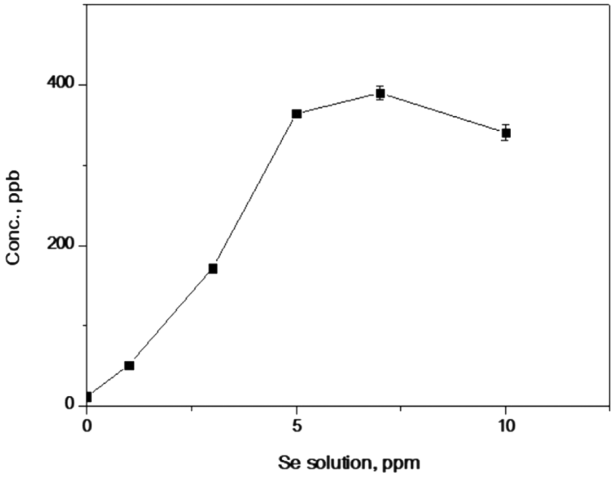


***Figure* 4.** Accumulation of Se in soy bean sprout with different concentration of cultivating Se solutions.

***Table* 2.** Selenium concentration (average±standard deviation) of bean sprout cultivated at different cultivating solutions

Conc. of growth solution, ppm	Conc. in bean sprout, ppb
0	11.8±0.8
1	51.1±0.1
3	171.5±0.1
5	364.2±0.1
7	389.8±8.9
10	340.2±9.7

셀레늄 수용액 1 ppm, 3 ppm과 5 ppm에서 재배된 콩나물은 셀레늄을 첨가하지 않은 콩나물의 비해 각 약 4배, 14배와 30배 정도의 셀레늄 강화현상을 보여주고 있다. 7 ppm과 10 ppm 셀레늄 수용액의 경우에는 셀레늄의 흡수속도가 오히려 감소하는 경향을 나타내고 있는데 이는 흡수되는 성장속도와 마찬가지이다.

이러한 결과는 셀레늄을 강화한 사료를 먹인 가축의 연구[15]에서도 나타난 바 있으며 Lefsrud[16]는 높은 농도(1056 ppm)의 경우에 케일의 성장이 오히려 둔화되었다고 발표한 바 있고 양파[17]의 경우에도 300 ppm 이상의 경우에는 성장 및 흡수가 더 이상 증가되지 않음을 발표한 바 있다. 본 연구에서는 토양이 아닌 수용액재배의 경우, 콩나물에서 훨씬 더 낮은 10 ppm정도의 농도라 하더라도 오히려 식물의 성장에 방해가 되며 셀레늄이 흡수축적하는데 지장을 준다고 볼 수 있다. 즉, 하루에 수 차례 수용액을 살포하여 재배하는 콩나물의 경우에는 짧은 기간에 빨리 성장하므로 그 효과가 비교적 낮은 농도에서도 더 빠르게 나타난다고 볼 수 있다.

콩나물에 농축된 셀레늄의 양은 10일간 재배하였을 때에 최대치로 약 390 ppb를 얻을 수 있었다. 이 것은 약 30배의 농축효과이다. 엽채류에 대한 다른 국내 연구에서는 명월초에서 940 ppb로 약 40배의 농축배율을 보고하였고[18] 곡물이나 다른 채소에서는 더 높은 농도(~수 ppm)와 농축배율(~수천 배)을 보이고 있다.[14] 하지만 타 연구와 달리 본 연구에서는 수경재배이며 짧은 일주일 정도의 재배로도 충분한 농도를 보이고 있다. 그리고 콩나물은 한번에도 꽤 많이 섭취하므로 오히려 높은 농도의 경우, 셀레늄 중독증을 야기할 수 있으므로 적당히 낮은 농도가 더 필요할 것으로 생각된다.

콩나물에 함유된 셀레늄 화학종 분석

셀레늄 용액(selenite)으로 재배된 셀레늄 강화 콩나물에서 셀레늄 화학종들을 추출한 뒤 음이온 교환 크로마토그라피-ICP/MS로 분리검출 하였다. *Fig.* 5는 셀레늄 수용액을

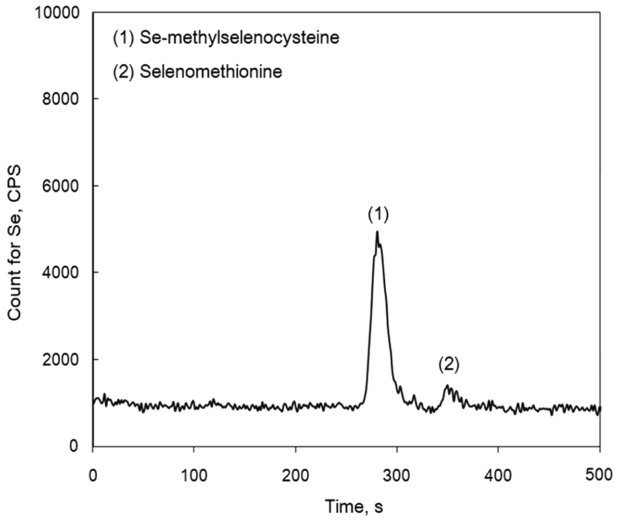


***Figure* 5.** Se species in soybean sprouts cultivated in 0 ppm selenium solution.

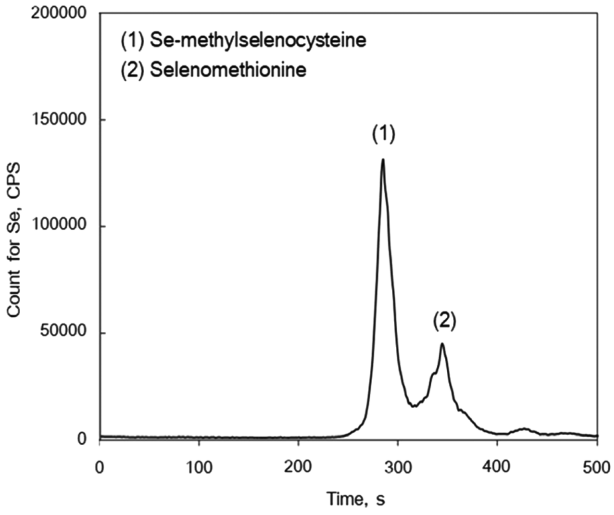


***Figure* 6.** Se species in soybean sprouts cultivated in 5 ppm selenium solution.

사용하지 않은 일반 콩나물에 대한 화학종 그림이며 *Fig.* 6은 5 ppm의 수용액에서 재배된 콩나물의 셀레늄 화학종의 분석 결과이다.

무기 셀레늄인 selenite나 selenate는 발견되지 않은 것으로 보아 이들은 콩나물에 별로 축적되지 않는 것으로 보인다. 두 콩나물의 성분은 모두 *Se*-methylselenocysteine (SeMcys)이 주성분으로 구성되어 있고, Selenomethionine (SeMet)이 부성분으로 구성되어 있음을 확인 할 수 있다. 하지만 셀레늄 수용액에서 재배된 셀레늄강화 콩나물의 경우(*Fig*. 6), 그 농도가 매우 높음을 볼 수 있다. 즉 셀레늄 강화 용액에서의 재배가 유효함을 보여준다. 대략적으로 두 피크의 면적비를 살펴보면 30:1정도로서 앞에서 보여준 농축비(*Table* 2)의 경우와 어느 정도 일치하고 있다. 가장 중요한 점은 SeMcys과 SeMet의 비를 조사해 보면 일반 콩나물보다 셀레늄 강화 콩나물의 경우에서 SeMet이 훨씬 더 큼을 알 수 있는데 이는 콩나물에서 셀레늄을 축적하는 대사과정에서 SeMet이 더 많이 생성됨을 의미하고 있다. 하지만 이러한 셀레늄 축적대사가 시간에 따라 어떻게 변하는지 그리고 또 다른 셀레늄 화학종들을 만들어 낼 지는 아직 알 수 없으며 더 많은 연구가 필요한 것으로 보인다.

본 연구에서는 셀레늄 용해수로 재배한 콩나물의 셀레늄 강화 정도를 분석하였다. 결과, 적절한 농도의 셀레늄 용액(5 ppm)은 성장을 촉진시키며 이는 다른 연구에서 보고된 바와 같이 일치한다. HPLC 이용한 콩나물 내 셀레늄 종 분석에서 콩나물은 SeMcys와 SeMet 으로 구성되어 있음을 확인하고 특히 SeMet의 양이 상대적으로 많이 증가함을 확인 할 수 있었다.

콩나물은 빠른 기간내에 쉽고 간단하게 셀레늄 강화식품을 얻을 수 있으며 국민의 사랑을 받는 식품으로 그 적용이 광범위하다. 또한 콩나물 재배의 경우에 셀레늄 수용액을 사용하므로 취급하기가 용이하고 토양에 비해 낮은 농도와 적은 양으로도 충분한 효과를 얻을 수 있으므로 오염을 방지할 수 있는 장점도 있다. 본 연구에서 얻은 콩나물에 대한 화학종 연구와 분석방법은 셀레늄 강화 콩나물을 건강식품으로 이용할 수 있는 기초자료가 되는 동시에, 앞으로 식품이나 약품에 화학종 분석기술을 도입하여 보다 정확한 화학종 정보를 얻게 되고 이는 국민의 건강증진에 도움이 될 수 있을 것으로 기대된다.

EXPERIMENTAL

본 연구에 사용된 콩나물의 품종은 국내산 쥐눈이콩으로 시중에서 구입하였고 4 ºC에서 보관하여 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 모든 용기와 기구는 강산으로 세척 후 건조하여 사용하였다. 본 연구에서 사용한 시약은 선행연구[19]에서 사용한 것들과 마찬가지이다.

기기 및 최적조건

본 연구에서는 충돌/반응셀(collision/reaction cell)을 가진 유도결합 플라즈마 질량분석기(Agilent 7500ce ICP/MS)를 사용하였다. HPLC pump는 Alltech의 HPLC Model 626 dual pump (Alltech, USA)을 사용하였고, 컬럼은 Symmetryshield^{TM} C_8 컬럼(Waters Korea, Seoul)을 사용하였으며 시료는 100 μl를 주입하였다.

ICP/MS 최적의 기기조건을 찾는 과정을 실시하였고 또한 충돌기체로 사용하는 H_2의 최적 흐름속도를 찾았는데 신호대 바탕비가 가장 높은 조건을 선택하였다. *Table* 3은 ICP/MS와 HPLC의 최적조건을 요약하여 나타낸 것이다. HPLC에서 가장 좋은 이동상의 제조는 5% methanol에 ion-pairing reagent로서 0.05%의 nonafluoravaleric acid를

Table 3. The optimum condition of HPLC-ICP/MS used in the experiment

Plasma Condition	
RF Power	1500 W
Sample Depth	8.7 mm
Carrier Gas	0.92 mL·min^{-1}
Makeup Gas	0.12 mL·min^{-1}
H_2	4.0 mL·min^{-1}
Chromatography Condition	
Column	Symmetryshield^{TM} RP_8 3.5 μm, 4.6×150 mm
Mobile Phase	5% methanol, pH 2.5
Ion Paring Reagent	0.05% nonafluorovaleric acid
Flow Rate	0.8 mL·min^{-1}

넣어 혼합한 후 pH를 2.5로 조절한 경우이었다. HPLC-ICP/MS의 최적조건을 찾은 후 셀레늄 화학종을 분리하고 민감하게 검출할 수 있는 최적조건을 찾았다.

콩나물재배

일정한 크기의 대두 종자를 500개 선별하여 4% sodium hypochlorite 용액으로 멸균과정을 거쳤다. 콩나물 재배에 사용된 물은 약 pH 7.3의 지하수이고, 선별된 콩은 지하수로 3회 씻어서 30분간 침지시킨 뒤 재배통에 넣어 길렀다. 셀레늄 수용액은 각 0, 1, 3, 5, 7, 10 ppm의 농도가 되도록 조제하여 지하수온과 동일한 13±1 ºC를 유지하였다. 재배는 셀레늄 용액으로 관수→회수→관수과정을 1일 8회 3시간 간격으로 거치게 하였다. 총 재배기간은 7일 동안으로 25±1 ºC의 생육실에서 재배하였다. 셀레늄 수용액 농도에 따른 콩나물의 물리적 변화를 파악하기 위해 콩나물 재배 시작 후 7일 동안 셀레늄 용액 별 무작위로 30개체씩 뽑아 콩나물 건조중량과 길이를 측정하였다.

시료의 처리 및 전처리

셀레늄 분석을 위한 전처리 는 재배된 콩나물을 증류수를 이용하여 3회 세척을 한 뒤, 105 ºC에서 2시간 건조 후 분쇄기와 막사사발을 이용하여 곱게 분쇄하였다. 콩나물분말 1 g을 비커에 넣고 70% 질산 20 mL을 가한 후 150 ºC에서 약 5시간 정도 가열한 뒤 방냉하였다. 다시 과산화수소 3 mL를 첨가하고 2시간 가열하여 분해한 후 상온까지 식혔다. 2% 질산으로 묽힌 후 0.25 μm 필터를 이용하여 2번의 필터링 후 분석하였다.

HPLC를 사용한 화학종 분석을 하기 전의 전처리 과정은 다음과 같다. 콩나물 분말에서 유기 셀레늄을 효율적으로 추출하기 위하여 효소를 사용하였다. 콩나물 시료 약 1 g 취하여 vial에 넣고, protease type XIV을 0.02 g를 넣은 다음 증류수를 약 5 g을 넣어 뚜껑을 닫고 37 ºC shaker에 24시간 두어 추출하였다. 그 다음 10분간 원심분리(3000 rpm) 후 상등액을 분리하여 filter (0.25 μm, Whatman)로 2회 거른 뒤 사용하였다.

REFERENCES

1. Rotruck, J.; Pope, A. L.; Ganther, H. E.; Hafeman D. G.; Hoekstra, W. G. *Science* **1973**, *179*, 588.
2. Eklow, L.; Thor, H.; Orrenius, S. *FEBS Lett.* **1981**, *127*, 125.
3. Peters, U.; Takata, Y. *Mol. Nutr. Food Res*. **2008**, *52*, 1261.
4. Schrauzer, G. N. *Cell. Mol. Life Sci.* **2000**, *57*, 1864.
5. Clark, L. C.; Combs, Jr., G. F; Turnbull, B. W.; Slate, E. H.; Chalker, D. C.; Chow, J.; Davis, L. S.; Glover, R. A.; Graham, G. F.; Gross, E. G.; Krongrad, A.; Lesher, Jr. J. L; Park, H. K.; Sanders, B. B.; Smith, C. L.; Taylor, J. R. *JAMA* **1996**, *276*, 1957.
6. Ip, C.; Thompson, H. J.; Zhu, Z.; Ganther, H. E. *Cancer Res.* **2000**, *6*, 2882.
7. Shrift, A.; Ulrich, J. M. *Plant Physiol.* **1969**, *44*, 893.
8. Tsavachidou, D; McDonell, T. J.; Wen, S.; Wang, X.; Vakar-Lopez, F.; Pisters, L.L.; Pettaway, C. A.; Wood, G.; Do. K.; Thall, P.; Stphens, C.; Efasfhiou, E.; Taylor, R.; Menter, D.; Troncoso, P.; Lippman, S.; Logothetis, C.; Kim, J. *M. Mat. Cancer Inst.* **2009**, *101*, 306.
9. Frias, J.; Gulewicz, P.; Martinez-Villaluenga, C.; Penas, E.; Piskula, M.; Kozlowska, H.; Ciska, E.; Gulewicz, K. Vidal-Valverde, C. *J. Agr. Food Chem.* **2010**, *58*, 2331.
10. Shibata, Y.; Morita M.; Fuwa, K. *Adv. Biophys.* **1992**, *28*, 31.
11. Kahakachchi, C.; Boakye, H.; Uden, P.; Tyson, J. *J. Chromatogr.* **2004**, *52*, 3761.
12. Sugihara, S.; Kondo, M.; Chihara, Y.; Yuji, M.; Hattori H.; Yoshida, M. *Biosci. Biotech. Bioch.* **2004**, *68*, 193.
13. Whanger, P. D.; Ip, C.; Polan, C. E.; Uden P. C.; Welbaum, G. *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, *48*, 5723.
14. Arscott S.; Goldman, I. *HortScience* **2012**, *47*, 497.
15. Juhasz, A. L.; Smith, E.; Weber, J.; Rees, M.; Rofe, A.; Kuchel, T.; Sansom, L.; Naidu, R. *Environ. Health Persp*. **2006**, *114*, 1826.
16. Lefsrud, M. G; Kopsell, D. E.; Randle, W. M. *J. Agr. Food Chem.* **2006**, *54*, 1764.
17. Barak, P; Goldman, I. *J. Agr. Food Chem.* **1997**, *45*, 1290.
18. Patent Shinil company. Korea Intellectual Property Office 10-2015-00524337, **2013**.
19. Jang, H.; Min, H.; Lee, J.; Pak, Y. *Anal. Sci. Technol*. **2013**, *26*, 182.