곰팡이 독소 위험 평가 : 규제되지 않는 독소를 포함하여

곰팡이 독소로 인식되는 저 분자량 화합물은 약 400 가지가 있으며, 사람 및 동물에게 독성을 갖고 있습니다. 그래서 식품 및 사료의 안전을 보장하기 위해 많은 국가에서 작물에 존재하는 곰팡이 독소에 대한 규제를 갖고 있습니다. 현재 많은 국가는 식품 및 사료 중의 곰팡이 독소에 대해 최대 농도를 규제한다거나, 적어도 지침 수준을 갖고 있습니다. 하지만, 이러한 규정들은 일반적으로 알려진 소수의 곰팡이 독소만을 규제합니다. 예를 들어, aflatoxin B1, B2, G1, G2, M1, fumonisin B1, B2, B3, ochratoxin A, deoxynivalenol, zearalenone, HT-2 독소, T-2 독소 등에 대한 규제만이 제정되어 있습니다. 이 곰팡이 독소들은 잘 분석되어 있으며, 연구 문헌에서 자주 다루어집니다.

하지만, 거의 400 종류의 규제가 없는 곰팡이 독소에 대해서는 어떤 것이 알려져 있을까요? 그 독소들 또한 동물이나 인간에게 위해를 끼칠 수 있을까요? 본 논문에서는 "신생 (emerging) 곰팡이 독소"과 "마스크 된 (masked) 곰팡이 독소"로 분류되는 규제되지 않고 있는 곰팡이 독소를 연구하고, 이들의 동시 발생에 따른 효과를 논의하고, 여러 곰팡이 독소가 동시에 존재하는 곡물 및 사료의 샘플을 분석하는 방법을 소개해 드리려고 합니다.

신생 (emerging) 및 마스크 된 (masked) 곰팡이 독소

연구자들이 많은 종류의 규제되지 않는 곰팡이 독소의 개별적/복합적 효과를 인식하게 된지는 얼마 되지 않았기 때문에, 규제되지 않는 독소들을 "신생 (emerging) 곰팡이 독소" 라고 부르고 있습니다. 신생 독소들을 측정하고 그에 따른 문제를 해결하는 방법에 대한 연구는 초기 단계에 있으며 급속히 발전하는 중입니다.

"신생 곰팡이 독소"의 하위 특수 범주 중 하나는 "마스크 된 (masked) 곰팡이 독소"입니다. 균류(fungi)는 잘 알려진 deoxynivalenol과 zearalenone 을 포함한 광범위한 대사 산물을 식물에 방출합니다. 그리고 숙주 식물은 종종 곰팡이의 대사산물의 결과물인 독소들을 추가로 변형시킵니다. 이 화학적 변형은 곰팡이 독소 종류 분별을 어렵게 하는 "마스크"를 제공합니다.

그러나 마스킹(masking)은 숙주 식물의 중요한 해독 전략 중 하나이기 때문에, 숙주 식물에 중요한 역할을 합니다. 보통 포도당 분자 또는 황산염이 접합되어 해독에 관여합니다. 이 마스킹 된 독소는 식물에 더 이상 위해를 끼치지 않지만, 인간과 동물 등 포유류의 소화 과정 중 위장관에서 마스킹이 끊어질 때 독성이 다시 나타날 수 있습니다. (그림 1). 식물 육종에서 일부 마스킹 곰팡이 독소 발생의 증가는 저항성이 높은 새로운 품종과 관련이 있을 수 있습니다. 예를 들어 deoxynivalenol-3-glucoside는 푸사리움 적매병

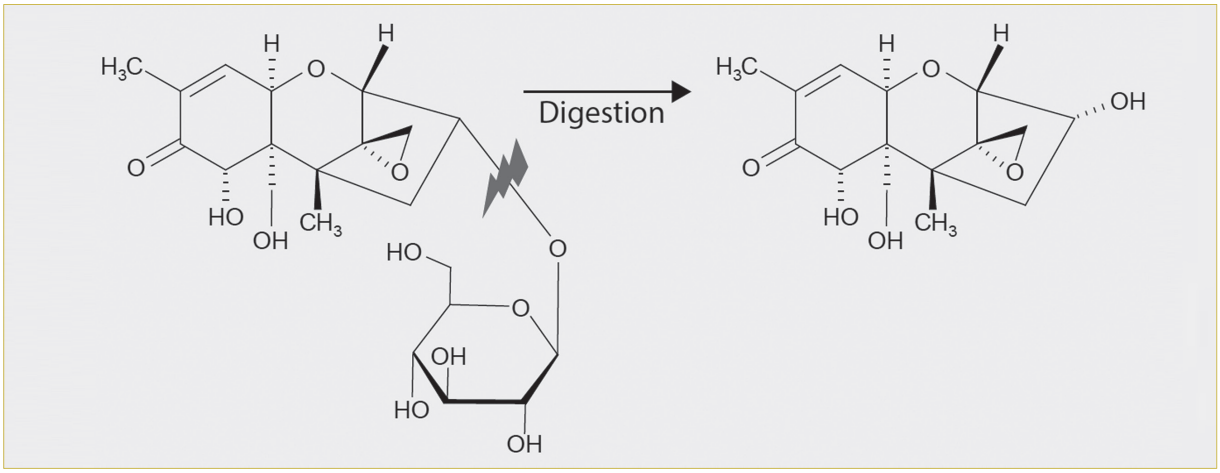

그림 1. 소화 중 deoxynivalenol-3-glucoside의 절단에 의한 deoxynivalenol로의 환원 (자료 : Romer Labs)

(Fusarium head blight)에 대한 내성과 관련이 있는 것으로 알려져 있습니다. fusarium 내성 식물은 전체 DON의 농도가 낮지만, 마스킹 곰팡이 독소의 생성량이 증가하여 더 높은 DON-3-Glu/DON 비율이 보고되었습니다.

"변형된 (modified) 곰팡이 독소"는 형태가 변형된 곰팡이 독소를 모두 아우르는 새로운 용어입니다. 변형된 곰팡이 독소는 곰팡이 자체에 의한 독소 분자의 변형과 식물 조직 내에서 발생하는 마스킹을 모두 포함합니다. 또 다른 형태의 변형은 포유류 체내에서 이루어 지는데, Aflatoxin B1으로 오염된 사료를 통해 섭취하면 또 다른 유형의 변형이 일어나 Aflatoxin M1으로 변합니다. 이 Aflatoxin M1은 수유중인 동물의 젖으로 배출됩니다. 또한, 독소의 변형은 식품 가공, 특히 가열 및 발효 중에도 발생할 수 있으며, 이로 인해 여러 곳에서 광범위하게 진행됩니다. 이렇게 변형 된 곰팡이 독소는 식품과 사료에서 발생할 수 있습니다.

모든 곰팡이 독소 중 자주 관찰되는 변형과 관련한 연구는 deoxynivalenol에 대해서 가장 깊이 진행 되었습니다. 변형 된 deoxynivalenol은 크게 마스킹 (masked) 형태와 변화한 (altered) 형태의 두 가지 주요 그룹으로 나눌 수 있습니다. 곰팡이 자체에 의해 변화한 deoxynivalenol의 형태는 fusarium으로 오염된 곡물에서 발견되는 3-acetyl-deoxynivalenol과 15-acetyl-deoxynivalenol이 있습니다. 식물은 deoxynivalenol을 deoxynivalenol-3-glucoside로 마스킹 할 수 있으며, 최근의 연구에서 알 수 있듯이 deoxynivalenol-3-sulfate와 deoxynivalenol-15-sulfate 라는 2 개의 술폰화 (sulfonated) 된 마스킹 형태가 될 수

있습니다.

그렇다면 변형되거나, 마스킹 되거나, 또 다른 신생 곰팡이 독소들이 끼칠 수 있는 해악은 어떤 것들이 있을까요? 변형된 곰팡이 독소는 모 화합물보다 독성이 많을 수도, 적을 수도 있습니다. 예를 들어, 변형으로 인해 생체 이용 가능성 (bioavailable)이 더 높을 수도 있습니다. 변형된 곰팡이 독소에 대한 독성학적 연구는 아직 부족한 편이며, 이러한 화합물이 어떤 위험 요소 및 영향을 미치는지에 대한 연구 결과는 아직 충분하지 않습니다. 위험 요소에 대한 부족한 이해는 위험 평가를 적절히 수행할 수 없도록 합니다. 그럼에도 불구하고 식품 안전에 대한 잠재적 위협에 대한 연구가 있었습니다. 마스킹 곰팡이 독소의 마스킹 부분은 동물과 사람의 소화관에서 제거 될 수 있으며, 이 경우 독성이 있는 모 화합물을 다시 방출합니다. 다른 신생 곰팡이 독소에서도 비슷한 상황이 존재합니다. 하지만 전반적으로 독성학적 연구 자료가 부족하여 사람 및 동물을 잠재적인 위험으로부터 보호하기 위한 규제 및 최대 내약 한도를 설정하는 것이 어렵습니다.

변형된 곰팡이 독소는 모 곰팡이 독소와는 화학적 반응성이 다르기 때문에 일반적인 분석에서는 놓치기 쉽습니다. 식품과 사료에 대해 규제되고 있는 곰팡이 독소에 대한 현재의 검출법은 변형된 곰팡이 독소에 대한 스크리닝을 법적으로 요구하지 않습니다. 이러한 표준 검사를 통해서는 규제 농도 이하의 값이 나타날 수 있으며, 변형된 곰팡이 독소에 의한 오염은 검출되지 않습니다. 표준 방법의 값은 맞지만, 독성학적 관점에서는 변형된 독소에 대한 합계 매개 변수를 통합해서 분석해야 더 정확한 분석이 가능합니다. 그리고 합계 매개 변수 분석이 될 때 변형된 곰팡이 독소가 인간의 건강에 미칠 수 있는 잠재적 위험을 파악 할 수 있습니다. 변형된 곰팡이 독소 및 다른 신생 곰팡이 독소의 최대 수치에 관한 규정은 현재 유럽 식품 안전청 (European Food Safety Authority)에서 논의 중에 있습니다.

곰팡이 독소 동시 발생

이제 여러 종류의 곰팡이 독소가 동일한 곰팡이에 의해 생산된다는 것을 알게 되었으므로, 여러 곰팡이 독소의 수렴 효과(converging effects)에 대한 연구가 점차 증가하고 있습니다. 최근 수년간 여러 독립적인 연구에서 수집된 자료에 따르면 농산물은 종종 하나 이상의 곰팡이 독소에 의하여 오염되어 있는 것으로 나타났습니다. 곰팡이 독소의 독성학적 상호 작용은 전형적으로 시너지 효과를 보입니다. 이것은 동일한 샘플에 존재하는 둘 이상의 곰팡이 독소의 독성 효과가 개별 곰팡이 독소의 독성 효과의 합보다 더 크다는 것을 의미합니다. 결론적으로, 곰팡이 독소의 공존은 대부분 시너지 효과를 나타내는데, 매우 드문 케이스에서 서로의 독성을 상쇄하는 상반 작용 효과(antagonistic effects)를 나타내기도 합니다.

이러한 시너지 효과는 동물마다 다르게 나타나며 매우 복잡합니다. (그림 2)는 가금류에서 특정 곰팡이 독소의 시너지 효과와 첨가 효과(additive effects)를 보여줍니다. 예를 들어 Aflatoxin B1 (AFB1)은 규제되지 않는 두 가지 곰팡이 독소인 diacetoxyscirpenol과 cyclopiazonic acid와 함께 시너지 효과를 나타내며,

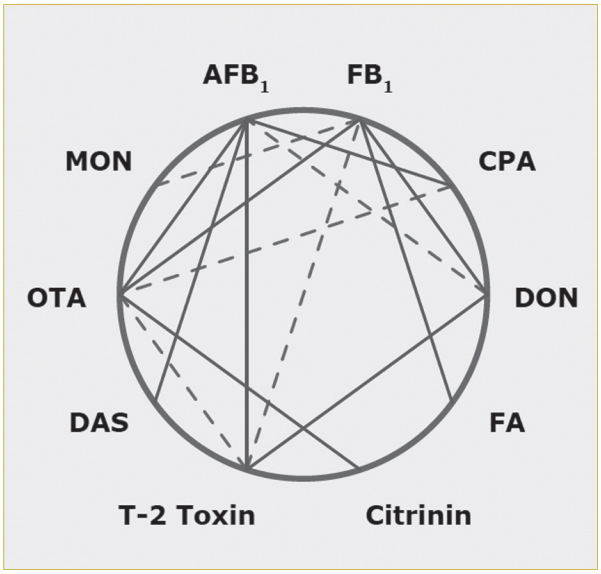

그림 2. 가금류에서 다중 곰팡이 독소의 시너지 효과 (적색 실선) 및 첨가 효과 (회색 점선) (자료 : BIOMIN)

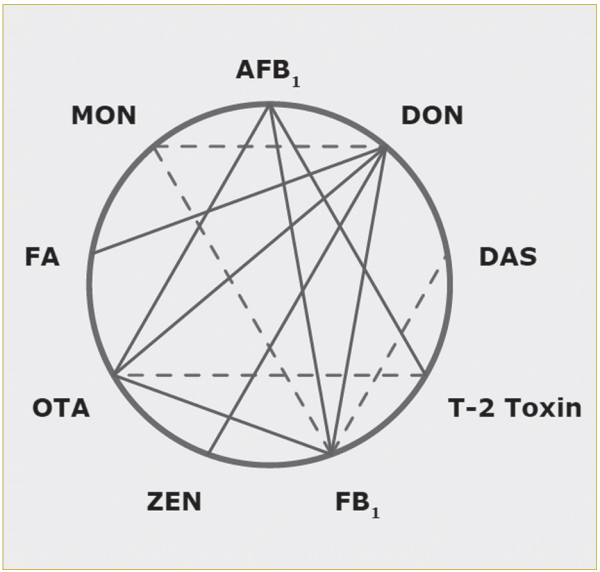

그림 3. 돼지에서 다중 곰팡이 독소의 시너지 효과 (적색 실선) 및 첨가 효과 (회색 점선) (자료 : BIOMIN)

규제되고 있는 곰팡이 독소인 DON과 함께 첨가 효과를 보입니다. 그러나 돼지에서 AFB1은 (그림 3)에서 보듯이 diacetoxyscirpenol과 cyclopiazonic acid와 시너지 효과가 없으며, 대신 T-2 독소 및 ochratoxin과 시너지 효과를 보입니다.

이는 동시 발생 효과의 몇 가지 예에 불과합니다. 곰팡이 독소 동시 발생에 대한 인식이 커지면서 여러 가지 곰팡이 독소를 동시에 분석하는 다중 곰팡이 독소 검출 방법 필요성이 점차 커지고 있습니다. 이러한 요구에 부응하여 Romer Labs는 Multi-Mycotoxin Analysis 50+ 방법을 개발했습니다. 이 분석은 aflatoxins, alternaria toxin, ergot alkaloids (맥각 알칼로이드), fumonisins, zearalenone 및 deoxynivalenol-3-glucoside와 같은 "마스크 된" 곰팡이 독소 분석을 포함하여, 샘플의 오염 패턴에 대한 고유한 통찰력을 제공하고 50 가지 이상의 곰팡이 독소를 정량 분석 합니다.

분석 가능한 독소의 종류 및 검사 가능한 샘플의 종류의 범위와 관련하여, 동시 분석법의 장점, 한계 및 향후 개선 방안에 대한 논의가 계속 될 예정입니다.

다중 곰팡이 독소 분석

분석가들은 다중 곰팡이 독소를 검출하기 위해, 사용하고 있는 검사 방법을 점차 LC-MS/MS (liquid

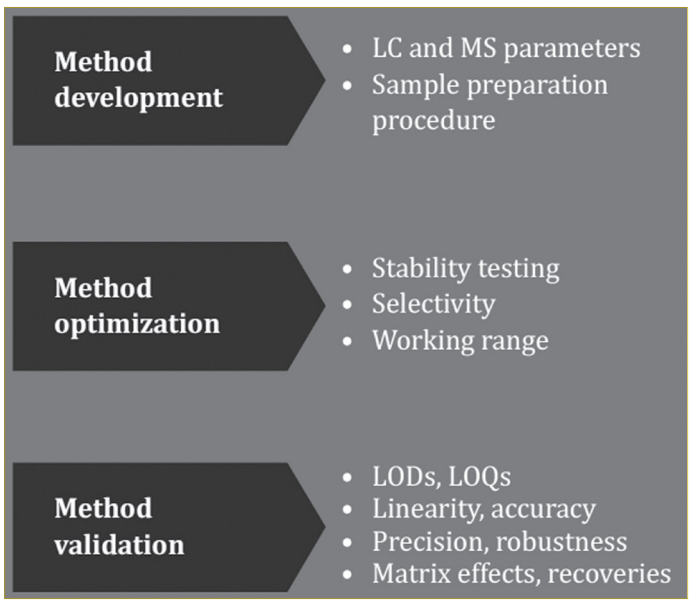

그림 4. 다중 곰팡이 독소 LC-MS/MS 분석법을 만들기 위한 각 단계 및 매개 변수

chromatography / tandem mass spectrometry)로 전환하고 있습니다. LC-MS/MS를 기반으로 한 분석 방법은 지난 10 년간 곰팡이 독소의 정성 및 정량 분석에서 효과가 좋은 가장 높은 수준의 기술이 되었습니다. 이 기술은 한번의 측정으로 산성 (fumonisins), 염기성 (ergot alkaloids), 극성 (moniliformin, nivalenol) 및 무극성 화합물 (zearalenone, beauvericin) 등 서로 다른 화학 계열에 속하는 광범위한 곰팡이 독소를 동시에 정량 분석 할 수 있습니다.

높은 감도 (sensitivity)와 높은 선택도 (selectivity) 이외에 LC-MS/MS의 또 다른 장점은 분석중인 물질의 질량 대 전하 비 (mass-to-charge ratios, m/z) 및 단편 이온 (fragment ions)에 대한 정보를 추가로 알 수 있다는 것입니다.

LC-MS / MS를 기반으로 하는 다중 곰팡이 독소 분석방법의 셋팅은 일반적으로 4 단계 프로세스를 따릅니다. 그 단계는 각각 개발(development), 최적화(optimization), 검증(validation) 및 적용(implementation)입니다. 각 단계와 매개 변수는 (그림 4)에 요약되어 있습니다. 개발 및 최적화 과정에서 결과의 질과 신뢰성을 신중하게 평가해야 합니다. 이를 위해 농도와 순도가 명시된 인증 받은 최고 품질의 분석 표준을 사용해야 합니다. 그러나 특정 분석물에 대해서는 분석 표준 물질이 상업적으로 이용 가능하지 않습니다. 그러한 경우 연구 과정 중에 있는 표준을 사용하거나, 분석이 제대로 완료되지 않은 물질을 표준으로 사용해서 검사 할 수는 있습니다.

개발 (method development)

LC-MS/MS 기반의 방법을 개발하는 동안 시료 준비 절차는 물론 MS 및 LC 매개 변수를 최적화해야 합니다. MS 매개 변수를 최적화하려면 각 표적 화합물의 순수한 분석 표준을 직접 질량 분석기에 주입해야 합니다. 이는 최상의 이온화(양 또는 음)와 가장 풍부한 전구체 (precursor) 및 생성물 이온(production ions)을 가능하게 합니다.

또한 크로마토그래피 조건을 이 단계에서 조정할 수 있습니다. 최적의 크로마토그래피 칼럼뿐만 아니라 이

상적인 이동상 및 경도(gradient)도 평가해야 합니다.

많은 다중 곰팡이 독소 분석 방법은 희석 - 주입(dilute-and-shoot) 방식을 사용합니다. 이것은 샘플 추출물을 LC-MS/MS에 주입하기 전에 희석하는 것을 말합니다. 클린업 단계도 역시 샘플 준비의 일부로 실행 될 수도 있습니다. 그러나 샘플 클린업 중에 곰팡이 독소의 패턴을 변경하면 안됩니다. 즉, 곰팡이 독소가 클린업에 사용 된 물질에 의해 함유(retained)되지 않도록 합니다.

최적화 (method optimization)

분석 방법의 최적화에는 표준 용액 및 샘플에서의 분석물 안정성 테스트뿐 아니라 교정 선택성 (proof selectivity) 및 작동 범위 (working range)결정이 포함됩니다.

검증 (method validation)

검증은 비교 가능성 (comparability) 및 추적성 (traceability) 측면에서 신뢰할 수 있는 결과를 얻기 위한 전제 조건입니다. 검증은 모든 필수 매트릭스의 각 분석 대상 목표에 대해 개별적으로 수행되어야 합니다. 정량적 방법의 유효성을 검증하는 동안 평가해야 하는 일반적인 성능 특성은 검출 한계 (LOD), 정량 한계 (LOQ), 선형성 (linearity), 정밀도 (precision), 선택도 (selectivity), 견고성 (robustness), 정확도 (accuracy), 매트릭스 효과 (matrix effect) 및 리커버리 (recovery) 입니다. Multi-Mycotoxin Analysis 50+의 경우, 유효한 매트릭스는 밀, 옥수수, 돼지 사료 및 사일리지입니다.

매트릭스 효과가 대상 분석물의 이온화 과정을 방해할 때 간섭 효과(interfere)가 발생합니다. 매트릭스 효과는 곰팡이 독소의 정량 분석에서 상당한 영향을 미칠 수 있습니다. 그러므로 매트릭스 효과를 확인하고 보정하는 것은 정확한 분석을 위해 필수적입니다. 보정은 확실한 리커버리를 알아낸 뒤 그 값으로 결과를 수학적으로 보정하거나, 매트릭스 매치 된 보정 또는 동위 원소로 표지 된 내부 표준을 적용하여 얻을 수 있습니다. 그 중 동위 원소로 표지된 내부 표준을 적용하는 방법이 샘플 당 가장 짧은 시간과 시간과 적은 비용으로 높은 수준의 정확도와 신뢰도를 갖는 결과를 이끌어 낼 것입니다.

이 방법은 복제된 빈 샘플을 여러 농도로 스파이킹하여 유효성을 검증할 수 있습니다. 가능한 경우, 인증된 표준 물질을 사용하여 방법의 정확도를 확인해야 합니다. 또한 매트릭스 매치한 재료(matrix-matched materials)와 숙련도 테스트의 참여를 통해 추가적인 품질 보증이 가능합니다.

결론

LC-MS/MS에 기반한 다중 곰팡이 독소 분석 방법의 개발은 곰팡이 독소 다중 발생의 위험에 대처 할 수 있는 높은 가능성을 보여줍니다. 분석자들이 신생 및 마스킹 곰팡이 독소를 비롯한 여러 가지 곰팡이 독소의 시너지 효과에 대해 점점 더 많은 지식을 습득하고 있음에 따라 동일한 샘플 내에서 이를 탐지 할 수 있는 검증 된 분석 방법이 중요성이 점점 더 커지고 있습니다.

그림 5. LC-MS/MS, 단일 측정으로 다양하고 광범위한 곰팡이 독소 동시에 측정 가능

LC-MS/MS 방법의 결과의 품질과 신뢰성에 중요한 영향을 주는 방대한 매개 변수는 개별 분석물과 개별 매트릭스에 대해서 신중하게 연구되어야 합니다. 또한, 곰팡이 독소의 화학적 다양성 때문에, 독소 분석을 위해 개발한 방법이 최적에서 다소 벗어나게 될 가능성이 있다는 것도 염두에 둬야 합니다. 더욱이 다양한 농산물은 물론 다양한 농도 범위와 다양한 발생 분포가 방법 개발 및 최적화에 또 다른 문제를 제기합니다. 그럼에도 불구하고, 다중 – 곰팡이 독소방법의 개발은 시급히 필요하며, 이 기술은 분석 결과에 대해 더 다양한 적용을 할 수 있도록 할 것입니다.

Yong Wee Liau, Romer Labs® Singapore
Managing Director