

연구노트

막걸리 중 ochratoxin A 분석의 개선

박 제 원*

헬스 캐나다 식품 연구부

Revision of the Analysis of *Makgeolli* for Ochratoxin A

Je Won Park*

Food Research Division, Food Directorate, Health Products and Food Branch, Health Canada

Abstract Because ochratoxin A recovery level of *Makgeolli* is lower (<50%) than those of other commodities such as rice, barley, and beer, *Makgeolli* was evaluated to improve the recovery and enable routine analysis. Use of 3% sodium bicarbonate instead of phosphate-buffered saline as homogenizing solution provided good recovery of ochratoxin A (>80%) spiked in *Makgeolli* at level of 1 ppb. To determine if this analytical method is reliable for ochratoxin A detection in *Makgeolli*, survey was conducted for ochratoxin A in 30 sterile *Makgeolli* samples retailed in Korea. Only two wheat-based *Makgeolli* samples contained detectable level of ochratoxin A (0.8 and 2.1 ppb) as confirmed by HPLC- electrospray ionization- mass spectrometry. Extraction of sample with 3% sodium bicarbonate for 3 min, followed by cleanup of extracts with immunoaffinity columns, and HPLC with fluorescence detection provided dependable detection of ochratoxin A in *Makgeolli* samples.

Key words: *Makgeolli*, ochratoxin A, HPLC-ESI-MS, HPLC-FD

서 론

Ochratoxin A는 1965년 남아프리카의 과학자들에 의해 *Aspergillus ochraceus*의 독성 대사물질로 발견된 이후, *A. ochraceus*군의 다른 종들과 *Penicillium verrucosum* 역시 생산하는 것으로 알려져 있다(1,2). 이들 곰팡이들은 보리, 밀, 귀리 등의 곡물에서 자주 발견되어 포장 중이나 저장 중에 그 독성물질인 ochratoxin A를 생산하고, 결국 곡물은 본 곰팡이독소의 주요 오염원이다(3). 한편 커피, 와인, 맥주 등과 곡물 사료로부터의 이행(carry-over)에 따른 돈육과 같이 다양한 식품 내 오염이 보고되고 있다(4-6). 국산 곡물 및 그 가공품을 대상으로 한 ochratoxin A의 오염 조사로부터 백미를 비롯한 일부 곡물 가공품에서도 그 오염이 확인된 바 있다(7-9). 여러 실험 동물에서 나타난 독성 및 역학 조사의 결과로부터, ochratoxin A는 신장에 치명적인 손상을 주며 특히 발칸반도 지역 주민들에게서 자주 나타나는 신장염과 같은 만성 풍토병의 원인물질로 의심 받고 있다(10,11). 이상의 결과로부터, 국제 암 연구소(International Agency for Research on Cancer)는 1993년 ochratoxin A를 인체 발암가능물질로 분류하였다(12). 현재 전 세계 31개 국가에서 곡물 혹은 그 가공품에 대하여 3-5 ppb의 잔류 허용기준을 설정 혹은 권고하고 있는데 비하여, 국내엔 아직 ochratoxin A 오염에 대한 관리 방안 및 식품 내 허용기준에 대한 설정이 마련되지 않고 있다(13). 한편 최근의 연구 결과에 따르면 백미 외에도 일부 보리 및 그 가공품인 맥주

시료에서 ochratoxin A의 오염이 확인된 바 있고, 그 오염도 및 오염 수치는 상대적으로 낮게 나타났으나 오염 식품들이 모두 한국인의 대표 식품으로 그 섭취량을 고려한다면 한국인의 공중 보건 상 문제점을 야기할 소지가 있었다(8,9). 하지만 Ochratoxin A의 오염도 및 각 식품의 일일 섭취량을 토대로 한 한국인의 ochratoxin A 일일 추정섭취량(Propable Daily Intake)은 WHO 산하 JECFA(the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)에서 설정한 일일 허용섭취량(Tolerable Daily Intake)인 14.3 ng/kg b.w./day를 크게 밀돌아, 한국인은 이상의 ochratoxin A 오염 식품들의 섭취에 따른 ochratoxin A의 건강상 위해로부터 안전함을 확인하였으며, 보다 정확한 ochratoxin A의 위해평가를 위해선 여러 다양한 곡물 및 그 가공품에 대한 꾸준한 오염 조사가 필요함을 논의한 바 있다(9,14). 그 중 쌀과 밀 등의 곡물을 주원료로 한 막걸리 내 ochratoxin A의 분석도 수행되었으나 50% 이하의 낮은 ochratoxin A 회수율은 그 분석법의 개선이 요구되었다(9). 특히 immunoaffinity column(IAC)만을 통한 막걸리 내 ochratoxin A의 회수율은 90%이상으로 높게 나타나, 시료의 진처리 및 곰팡이독소 추출과정 모두 막걸리 내 ochratoxin A의 검출 상 문제점 해결에 중요한 단서가 될 수 있음을 제시하였다(9). 본 연구에서는 IAC과 HPLC(high performance liquid chromatography) 기기 분석에 기반을 둔 막걸리 내 ochratoxin A 분석법을 확립하고, 그 개선된 분석법을 토대로 일부 시판 막걸리를 대상으로 ochratoxin A의 오염도를 조사하여 그 분석법의 효율성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

시약 및 표준물질

실험에 사용한 용매는 모두 HPLC급이며, 특급 이상의 시약이 사용되었다. Ochratoxin A 표준물질은 Sigma(St. Louis, MO,

*Corresponding author: Je Won Park, Food Research Division, Food Directorate, Health Products and Food Branch, Health Canada, Address Locator 2203D, Ottawa, Ontario K1A 0L2, Canada
Tel: 1-613-957-0979
Fax: 1-613-941-4775
E-mail: jewonpark@hotmail.com
Received July 20, 2005; accepted November 8, 2005

USA)에서 구입하였고 toluene : acetic acid(99 : 1, v/v)에 용해한 후, -18°C 냉동 암소에 보관하였다. 또한 본 표준 용액을 HPLC 이동상인 acetonitrile : water : acetic acid(57 : 43 : 2, v/v)에 적절히 희석하여 HPLC 분석에 사용하였다.

시료

국내에서 시판되고 있는 살균막걸리 총 30점(쌀 막걸리 13점, 밀 막걸리 17점)을 2003년 4월과 5월 사이 서울 시내 소매점에서 구입하였으며 최소 채취량은 0.5 L였다. 제조 시 사용된 밀가루의 함량이 30% 이상인 막걸리는 밀 막걸리로 분류하였고 모든 시료는 분석까지 4°C에 냉장 보관하였다.

시료 내 ochratoxin A의 추출 및 전처리

막걸리 시료 내 ochratoxin A의 추출 및 전처리 과정은 Visconti 등(5)의 방법을 일부 수정하여 사용하였다. 즉 시료 20 mL을 9배 부피의 PBS 용액(phosphate-buffered saline, pH 7.0) 180 mL에 희석한 후, 10000 rpm 세기의 homogenizer(Polytron, Kinematica AG, Littau, Switzerland)에 3분간 시료를 균질화하였다. 이를 5000 g에서 10분간 원심 분리한 후 상등액을 Whatman #41로 여과하였다. 여과액 20 mL은 Park 등(9,14)의 방법과 같이 OchraTest IAC(Vicam, Watertown, MA, USA)를 이용하여 전처리 하였다. 한편 분석법의 개선, 즉 ochratoxin A의 회수율을 향상시키기 위하여 PBS 용액 대신 sodium bicarbonate(1, 3, 5%)를 사용하였고 시료를 희석하지 않고 직접 IAC에 주입하여도 보았다(15). 또한 시료의 균질화 시간(1, 3, 10분)에 따른 ochratoxin A의 회수율에 변화가 있는지도 알아 보았다. 각 처리 군의 회수율 측정을 위하여, ochratoxin A가 검출되지 않은 막걸리 2점을 선발하여 1 ppb 수준으로 ochratoxin A를 첨가한 후 전술한 조건으로 처리하였고 후술한 형광검출 HPLC로 분석하였다. 모든 처리 군을 3반복으로 분석하였다.

분석법

전처리 된 시료 용출액을 45°C에서 질소로 건조시키고 HPLC 이동상으로 다시 용해시킨 후 HPLC 기기 분석에 사용하였다. 우선 ochratoxin A의 형광검출(FD, fluorescence detection)에 이용된 HPLC-FD 기기는 다음과 같다(8,9,14). Pump(Waters, model 616, Milford, MA, USA); injector(Waters, model 717 plus auto-sampler); fluorescence detector(Waters, model 474, λ_{ex} = 330 nm λ_{em} = 440 nm). 분석에 사용한 컬럼은 Nova-Pak C₁₈(Waters, 3.9 mm × 150 mm, 5 μ m)이며 이동상으로 acetonitrile : water : acetic acid (57 : 43 : 2, v/v)를 0.5 mL/min 유속으로 흘렸다. 본 기기의 ochratoxin A 검출 한계(signal/noise = 5)는 0.2 ppb이었다. 한편 형광검출 HPLC 분석법으로 곰팡이독소의 오염이 확인된 시료 내 ochratoxin A의 확정실험으로 이용되었던 HPLC-ESI(electrospray ionization)-MS(mass spectrometry) 기기는 다음과 같다(8,9,14). HP 1100 system(Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA); VG Biotech platform MS(VG Biotech., Cheshire, UK). MS 내 설정 cone voltage 및 질소 분무가스의 유속은 90 eV와 25 L/hr였다. 분석에 사용한 컬럼은 UltraCarb ODS30(Phenomenex, Torrance, CA, USA; 2.0 mm × 250 mm, 5 μ m)이며 이동상으로 acetonitrile : methanol : 40 mM formic acid(1 : 1 : 1, v/v)를 0.2 mL/min 유속으로 흘렸다. 분자 이온 [M+H]⁺ 및 주요 단편 이온 [M+H-H₂O-CO]⁺은 각 각 m/z = 404와 358로 검출되었다.

통계

임의로 ochratoxin A를 첨가한 시료 2점을 대상으로 수행된 각 처리군 간 ochratoxin A 회수율의 차이가 유의(p < 0.05)한지, 또한 시료 내 ochratoxin A의 오염도 및 오염수준에 차이가 있는지를 통계분석하기 위하여 SigmaStat(Jandel Scientific., version 3.0, San Rafael, CA, USA)을 이용한 ANOVA 기법을 실시하였다.

결과 및 고찰

시료 중 Ochratoxin A의 회수율

이전의 연구(8,9)를 통해, 본인은 맥주를 대상으로 한 ochratoxin A의 분석은 회수율이 80% 이상이며 분석 간의 재현성을 위한 표준편차가 5-8% 사이로 만족할 만한 수준이었음을 확인하였다. 그에 비해 막걸리의 경우 똑같은 음료 형태 시료의 전처리 및 분석법이 도입되었음에도 불구하고 ochratoxin A의 회수율이 50% 이하였고, IAC만을 통한 막걸리 내 ochratoxin A의 회수율은 90% 이상으로 높게 나타나, 막걸리 시료 내 ochratoxin A의 전처리 및 추출과 연관되는 추가 연구가 필요함을 시사한 바 있었다(9). 기존의 PBS 용액을 대신한 sodium bicarbonate의 %농도 별 그리고 균질화 시간(min)에 따른 첨가 ochratoxin A의 회수율 변화를 Fig. 1에 나타내었다. Ochratoxin A를 2 ppb 수준으로 첨가시킨 막걸리를 3% sodium bicarbonate를 이용하여 3분간 균질화할 경우 가장 높은 82 ± 3%의 회수율이 관찰되었고, 특히 3% sodium bicarbonate 처리 군은 다른 %농도와는 통계적으로 유의한 결과를 보여 주었다(p < 0.05). Shephard 등(16) 또한 최근 포도주를 대상으로 한 ochratoxin A의 분석에서, IAC 전처리 전에 sodium bicarbonate를 시료의 균질화를 위해 사용한 바 있다. 결국 본 실험을 통하여 막걸리 시료의 균질화 용액을 PBS 용액 대신에 3% sodium bicarbonate으로 이용할 경우, 막걸리 내 ochratoxin A의 검출이 용이해졌다.

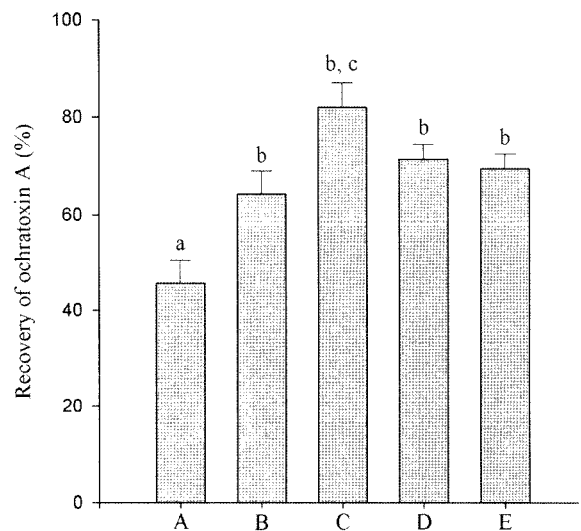


Fig. 1. Effect of the content of sodium bicarbonate and homogenizing time on the recovery of ochratoxin A added to *Makgeolli* (n=3) extracted with (A) PBS (phosphate-buffered saline) for 3 min; (B) 1% sodium bicarbonate for 3 min; (C) 3% sodium bicarbonate for 3 min; (D) 5% sodium bicarbonate for 3 min; (E) 3% sodium bicarbonate for 10 min. Different letters indicate significant (p < 0.05) differences within each conditions.

Table 1. Number of contaminated samples and levels of ochratoxin A in 30 samples of sterile *Makgeolli* marketed in Korea

<i>Makgeolli</i>	No. of sample	Ochratoxin A range (ppb)		
		>0.2	0.2-2.0	>2.0
Rice-based	13	13	1 (0.8 ppb) ²⁾	1 (2.1 ppb) ²⁾
Wheat-based ¹⁾	17	15		

¹⁾Wheat flour was used more than 30% of the basis for brewing of *Makgeolli*.

²⁾Values in parentheses indicate ochratoxin A content detected by HPLC-FD. Positive samples were also confirmed by HPLC-ESI-MS for the presence of ochratoxin A.

시료 중 Ochratoxin A의 오염 조사

개선된 분석법을 사용하여 국내 시판 중인 살균막걸리 30점을 대상으로 ochratoxin A의 오염을 조사한 결과, 밀 막걸리 2점 (6.7%)에서 그 오염이 확인되었다(Table 1). 두 시료의 오염수준은 각각 0.8 및 2.1 ppb로 세계 여러 나라에서 설정하고 있는 식품 내 잔류 허용기준치인 3-5 ppb 보다 낮은 수준이었다(Fig. 2). 그 오염도의 결과는 Park 등(7-9)의 결과에서 나타난 국내 유통 중인 밀가루나 맥주 등 곡물 가공품의 오염도보다는 높으나 쌀이나 보리 등 곡물의 오염도보다는 낮게 나타났으며, 그 오염수준은 비슷하였다. 특히 밀 막걸리 및 쌀 막걸리 시료 간의 오염도에 통계적으로 유의한 차이가 나타나진 않았지만, 발효 원료에 밀가루가 30% 이상 포함되는 밀 막걸리 시료 2점에서 ochratoxin A의 오염이 확인된 것으로 미루어 원료로 이용된 밀가루의 ochratoxin A 오염을 의심할 수 있다. 한편 2001년 한국인의 일일 막걸리 섭취량은 4.9 g으로 남성 노년층으로 갈수록 그 소비량이 늘어나는 것으로 나타났으며 한국인의 평균체중을 55 kg으로 가정할 경우, 한국인의 막걸리 섭취를 통한 ochratoxin A 일일 추정섭취량은 8.5-25.2 pg/kg b.w./day범위에 있어 ochratoxin A의 일일 허용섭취량(14.3 ng/kg b.w./day)의 0.2% 미만이었다(9,17). 이상의 연구 결과로부터, 개선된 분석법은 막걸리 내 ochratoxin A의 오염을 검출하는데 유용하며 막걸리와 같은 곡물 가공품의 경우엔 그 원료의 곰팡이독소 오염에 유의해야 함을 알 수 있었으며, 마지막으로 한국인은 막걸리 섭취를 통한 ochratoxin A의 건강상 위해로부터 안전한 것으로 파악되었다.

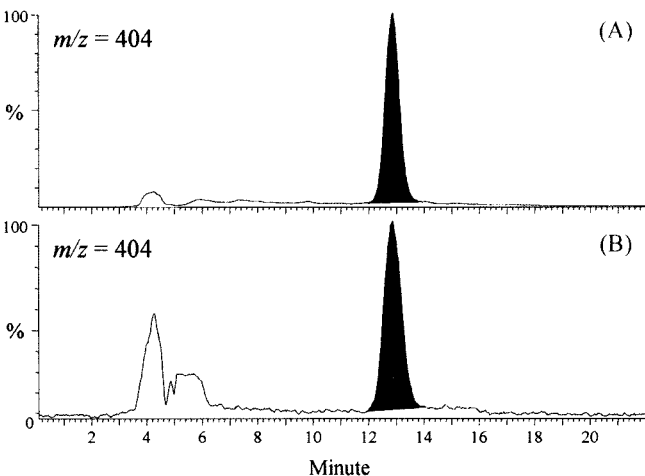


Fig. 2. HPLC-ESI-MS chromatograms of sterile *Makgeolli* samples (A) spiked with ochratoxin A (1 ppb) and (B) naturally contaminated with ochratoxin A (2.1 ppb).

요 약

이전의 연구 결과에 나타난 바 있는 막걸리 중 ochratoxin A의 낮은 회수율(<50%)은 시료 내 본 곰팡이독소의 추출 혹은 전처리 과정의 개선이 필요함을 지적하였다. 본 연구에서 막걸리 시료의 균질화에 이용되던 추출 용액을 PBS 용액 대신 3% sodium bicarbonate 용액으로 채택할 경우, 80% 이상의 첨가된 ochratoxin A가 회수되어 그 검출이 용이해졌다. 한편 개선된 해당 분석법의 막걸리 시료에 대한 적용 가능성을 알아보기 위하여 국내 시판 중인 살균막걸리 30점을 대상으로 분석한 결과 밀 막걸리 2점에서 ochratoxin A가 검출되었고(0.8, 2.1 ppb), 그 결과를 다시 HPLC-ESI-MS로 확정하였다. 본 연구를 통해 수행된 개선된 시료 전처리 방법(3% sodium bicarbonate)과 병행된 IAC 및 HPLC-FD 분석법은 막걸리를 대상으로 한 ochratoxin A의 오염 조사에 유효한 분석법임이 확인되었다.

문 헌

- van der Merwe KJ, Steyn PS, Fourie L, Scott DB, Theron JJ. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature* 205: 1112-1113 (1965)
- Pitt JI. Biology and ecology of toxigenic *Penicillium* species. *Adv. Exp. Med. Biol.* 504: 29-41 (2002)
- Walker R. Risk assessment of ochratoxin: current views of the European Scientific Committee on food, the JECFA and the Codex Committee on Food Additives and Contaminants. *Adv. Exp. Med. Biol.* 504: 249-255 (2002)
- Lombaert GA, Pellaers P, Chettiar M, Lavalee D, Scott PM, Lau BP. Survey of Canadian retail coffees for ochratoxin A. *Food Addit. Contam.* 19: 869-877 (2002)
- Visconti A, Pascale M, Centonze G. Determination of ochratoxin A in wine and beer by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatographic analysis with fluorometric detection: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Intl.* 84: 1818-1827 (2001)
- Dragacci S, Grosso F, Bire R, Fremy JM, Coulon S. A French monitoring programme for determining ochratoxin A occurrence in pig kidneys. *Nat. Toxins* 7: 167-173 (1999)
- Park JW, Kim EK, Shon DH, Kim YB. Natural co-occurrence of aflatoxin B₁, fumonisin B₁ and ochratoxin A in barley and corn foods from Korea. *Food Addit. Contam.* 19: 1073-1080 (2002)
- Park JW, Choi SY, Hwang HJ, Kim YB. Fungal mycoflora and mycotoxins in Korean polished rice destined to humans. *Intl. J. Food Microbiol.* 103: 305-314 (2005)
- Park JW, Chung SH, Kim YB. Ochratoxin A in Korean food commodities: occurrence and safety evaluation. *J. Agric. Food Chem.* 53: 4637-4642 (2005)
- O'Brien E, Heussner AH, Dietrich DR. Species-, sex-, and cell type-specific effects of ochratoxin A and B. *Toxicol. Sci.* 63: 256-264 (2001).
- Tatu CA, Orem WH, Finkelman RB, Feder GL. The etiology of Balkan endemic nephropathy: still more questions than answers. *Environ. Health Perspect.* 106: 689-700 (1998)
- Castegnaro M, Wild CP. IARC activities in mycotoxin research. *Nat. Toxins* 3: 327-331 (1995)
- van Egmond HP, Jonker MA. Current regulations governing mycotoxin limits in food. pp. 49-68. In: *Mycotoxins in Food: detection and control.* Magon N, Olsen M. (eds.) CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, USA (2004)
- Park JW, Chung SH, Lee C, Kim YB. Fate of ochratoxin A during cooking of naturally contaminated polished rice. *J. Food Prot.* 68: 2107-2111 (2005)
- Castellari M, Fabbri S, Fabiani A, Amati A, Galassi S. Comparison of different immunoaffinity clean-up procedures for high-performance liquid chromatographic analysis of ochratoxin A in wines. *J. Chromatogr. A.* 888: 129-136 (2000)
- Shephard GS, Fabiani A, Stockenstrom S, Mshicileli N, Sewram V. Quantitation of ochratoxin A in South African wines. *J. Agric. Food Chem.* 51:1102-1106 (2003)
- Korea Ministry of Health and Welfare. 2001 National Health and Nutrition Survey-Nutrition Survey. KMOHW, Gwacheon, Korea (2002)