

옥수수 및 현미에서 효소적 탈아세틸화가 T-2와 HT-2 독소 분석에 미치는 영향

이수진 · 하상도¹ · 전향숙*

한국식품연구원 안전유통연구단, ¹중앙대학교 식품공학과

Effect of Enzymatic Deacetylation of T-2 Toxin on the Analysis of T-2 and HT-2 Toxins in Corn and Brown Rice

Sujin Lee, Sang-Do Ha¹, and Hyang Sook Chun*

Food Safety Research Group, Korea Food Research Institute

¹Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University

Abstract Through an analysis of T-2 and HT-2 toxins in corn and brown rice, the effect of enzymatic deacetylation of T-2 toxin on HT-2 toxin was investigated. Gas chromatography (GC) with electron capture detection and high-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection were used for quantitative determination. T-2 toxin was converted into HT-2 (84-86%) within 15 min in the presence of crude protein extracts from corn and brown rice. The absence of T-2 conversion was observed for autoclaved samples, in which the enzymes were inactivated. When phosphate buffered saline, followed by methanol, was used as the extraction solvent, recoveries of T-2 toxin spiked at 50 and 200 µg/kg were from 60 to 87%, whereas those of HT-2 in the autoclaved samples were 0%. In non-autoclaved samples, recoveries of HT-2 were 37-66%, whereas those of T-2 were negligible. However, the conversion of T-2 into HT-2 was not observed when samples were extracted by methanol/water.

Keywords: T-2 toxin, HT-2 toxin, enzymatic deacetylation, GC, HPLC

서 론

사람이나 동물에서 발암성, 급성 및 만성적 질병을 유발하는 곰팡이독소의 대부분은 *Aspergillus*속, *Penicillium*속 및 *Fusarium*속 곰팡이에 의해 주로 생성되는 이차대사산물이다(1). 대표적인 예로 aflatoxin, fumonisin, ochratoxin, trichothecenes 및 zearalenone 등이 있다. 이 가운데 trichothecenes는 *Fusarium*속 곰팡이에 의해 생성되는 곰팡이독소로, 온대지방에서 생산된 곡물에서 흔히 발생한다(2). 우리나라는 온대지방에 속하고, 곡물을 주식으로 하기 때문에 aflatoxin보다는 *Fusarium* 곰팡이독소에 노출될 위험성이 크다(1,2).

Trichothecenes는 9번 탄소와 10번 탄소 사이의 이중결합과 12번 탄소와 13번 탄소에 에폭시(epoxy)그룹을 가지는 세스퀴테르펜 에폭사이드(sesquiterpene epoxide)로, 8번 탄소자리의 카르보닐(carbonyl)그룹의 존재여부에 따라 type A와 type B로 분류된다(3,4). T-2 독소와 HT-2 독소를 포함한 acetyl T-2 toxin, deacetoxyscirpenol, 15-acetoxyscirpenol 및 neosolaniol이 type A trichothecenes에 속한다. Type B trichothecenes에는 nivalenol(NIV),

deoxynivalenol(DON), 15-acetyldeoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol 및 fusarenone X가 속한다. 이 가운데 주로 자연계에서 오염이 보고되는 trichothecene는 T-2 독소, HT-2 독소, NIV 및 DON 등이다(5,6).

T-2 독소는 강력한 단백질 합성저해제로 알려져 있고, 독성은 trichothecene 중에서 가장 높다(4). HT-2 독소는 독성에 대한 직접적인 정보가 적고 T-2와 HT-2 독소를 비교한 자료가 제한되어 있지만 T-2 독소와 비슷한 독성 역가(potency)를 가지고 있는 것으로 보고되고 있다. 게다가 T-2 독소는 장에서 HT-2로 빠르게 전환되기 때문에, 관찰된 T-2 독소의 독성은 HT-2 독소의 독성이 포함될 수 있다(7). 이를 고려하여 FAO/WHO 합동 식품첨가물전문가위원회(Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)는 T-2 독소에 대한 잠정 일일 최대 섭취 한계량(Provisional Maximum Tolerable Daily Intake: PMTDI)을 T-2와 HT-2 독소의 합에 대해서 0.06 mg/kg body weight/day로 제한하였다. 그러나 식품 중 안전관리를 위한 기준치는 아직 유럽연합이나 국내에서 설정되어 있지 않다(8,9).

T-2와 HT-2 독소의 분석법은 enzyme linked immunosorbent assays(ELISA), lateral flow devices(LFD), fluorescence polarization immunoassay(FPIA) 등의 screening 분석법과 thin layer chromatography(TLC), gas chromatography(GC) 및 high-performance liquid chromatography(HPLC) 등의 기기분석법이 있다(4-6,10,11). 이 가운데 GC 및 HPLC를 이용한 방법들이 주로 이용되고 있으나 정확성(accuracy), 정밀성(precision) 등의 측면에서 개선이 필요하기 때문에 아직 GC 및 HPLC를 기반으로 한 공인분석법이 없는 실정이다(10,11).

*Corresponding author: Hyang Sook Chun, Food Safety Research Group, Korea Food Research Institute, Seongnam, Gyeonggi 463-746, Korea

Tel: 82-31-780-9273

Fax: 82-31-709-9876

E-mail: hschun@kfri.re.kr

Received March 26, 2012; revised May 8, 2012;

accepted May 16, 2012

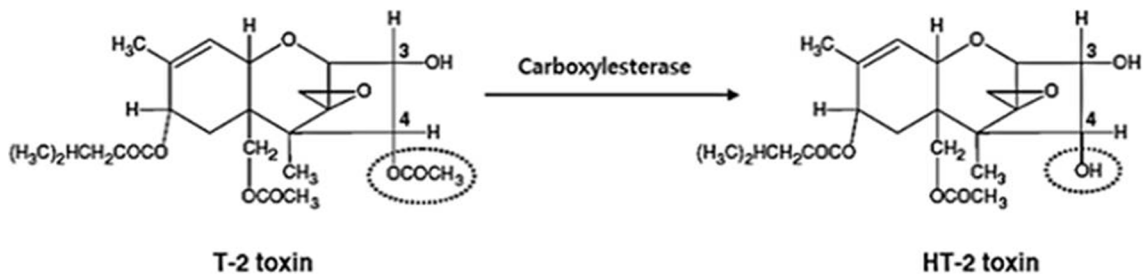


Fig. 1. The selective deacetylation at the C-4 position of T-2 toxin to give HT-2 toxin, catalyzed by carboxylesterases (14).

T-2 독소는 carboxylesterase(EC 3.1.1.1 carboxylic-ester hydrolase 또는 trichothecene esterase)에 의해 4번 탄소의 아세틸그룹이 탈아세틸화되어 HT-2 독소를 형성하는 것으로 알려져 있다(Fig. 1). 이 반응은 주로 생체 내에서 일어나는 대사작용으로 보고되어 있으나 최근에는 식물이나 곰팡이에서도 보고되고 있다(12,13). Lattanzio 등(14)은 옥수수, 밀, 귀리 및 보리에 존재하는 carboxylesterase에 의해 시간경과에 따라 T-2 독소가 HT-2 독소로 탈아세틸화 된다고 보고하였다. 또한 Gershter 등(15)은 옥수수, 쌀, 수수 및 콩으로부터 단백질을 추출한 후 carboxylesterase 활성을 분석한 결과, 각 식물에 다양한 carboxylesterase 동위효소가 존재하며, 정량적인 차이가 있다는 것을 보고하였다. T-2 독소가 시료에 존재하는 carboxylesterase에 의해 HT-2 독소로 탈아세틸화 되는 작용은 T-2와 HT-2 독소를 각각 정량 분석할 때 분석치에 영향을 줄 수 있는 것으로 사료된다. 최근에는 NIV, DON 등 수용성이 높은 독소와 T-2, HT-2 독소 등 지용성이 높은 독소를 포함하는 trichothecenes 곰팡이독소가 식품에 동시 오염되는 것으로 보고되고 있어서(9,16,17) 이들 독소의 동시분석이 증가하는 추세이다. 이들 독소를 동시분석하기 위해서는 분석 대상 독소의 추출효율을 높이는 것이 중요하기 때문에 무엇보다도 추출용매 및 추출방법의 선정이 중요하다(16,17). Lattanzio 등(18)은 용해도가 다른 다양한 곰팡이독소를 동시분석 하기 위해 수용성 용매와 지용성 용매를 동시에 사용한 결과, 사용 용매에 따라 T-2 독소가 HT-2 독소로 전환될 수 있는 가능성을 보고하였다. 그러나 식품 시료에 존재하는 carboxylesterase의 활성도, 이들 효소의 불활성화 및 추출용매와 방법이 T-2와 HT-2 독소 분석치에 미치는 영향을 조사한 연구는 거의 없다.

따라서 본 연구는 향후 분석법 확립에 도움이 되고자 옥수수와 현미 시료에 존재하는 carboxylesterase에 의한 T-2 독소의 탈아세틸화가 T-2와 HT-2 독소 분석치에 미치는 영향을 살펴보았다. 즉, 옥수수와 현미 시료로부터 제조된 carboxylesterase 조효소원에 의한 T-2 독소의 HT-2 독소로의 전환 정도를 살펴보고, autoclave에 의한 효소의 불활성화와 분석과정에서 사용되는 추출용매 및 방법이 GC 및 HPLC에 의한 독소 분석치에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

실험 재료

T-2와 HT-2 독소의 오염 다빈도 식품에 속하는 옥수수, 오염가능성이 높고 국내 섭취량이 많은 현미를 본 연구의 시료로 선정하였다. 분석에 사용한 옥수수는 2011년 4월 강원도 홍천에서 재배된 것을 구입하였다. 현미는 2011년 10월 충청북도 진천에서 재배된 벼를 수확하여 하루 동안 25°C 열풍건조기에서 건조시킨 후, 현미 도정기(HSMC-4, Hansung, Seoul, Korea)를 사용하여 도

정하였다. 옥수수 및 현미 시료는 분쇄기에 넣어 마쇄한 후 -20°C 냉동상태로 보관하면서 사용하였다.

분석 시약

T-2와 HT-2 독소 표준물질은 Biopure(Tulln, Austria)에서 구입하였고, 면역친화컬럼(immunoaffinity columns EASI EXTRACT T-2 and HT-2)는 r-Biopharm Rhone Ltd.(Darmstadt, Germany)에서 구입하였다. 유도체 반응에는 Sigma-Aldrich의 4-dimethylaminopyridine(4-DMAP)과 sodium bicarbonate(NaHCO₃), 1-anthroyl-cyanide(1-AN, Wako, Osaka, Japan) 및 trifluoroaceticanhydride(TFAA, Acros, USA)를 사용하였다. Glass microfibre filters(Whatman GF/B) 및 filter papers(Whatman No.1)는 Whatman(Maidstone, UK)에서 구입하였다. Phosphate buffered saline(PBS)는 PBS tablet(Amresco, Solon, OH, USA)을 3차 증류수에 녹여 사용하였다. Sodium chloride(NaCl)와 sodium sulfate anhydrous(Na₂SO₄)은 Junsei사(Tokyo, Japan)에서 구입하였고, mirex는 Supelco사(Lubbock, USA)에서 구입하여 사용하였다. 그 외 acetonitrile, methanol, hexanes 및 toluene등 유기용매와 사용된 시약은 특급 이상의 수준을 사용하였다.

Carboxylesterase 활성도 측정

옥수수와 현미에 존재하는 carboxylesterase의 활성도를 측정하기 위하여 조효소원을 제조하였다. 조효소원을 제조하기 위하여 옥수수 및 현미 200 g을 1000 mL의 10 mM PBS(pH 7.4)에 넣고 1시간 동안 25°C에서 진탕 추출(SI 600R, Jeiotech, Seoul, Korea)하였다. 이 추출액을 20분 동안 4000×g, 4°C의 조건으로 원심분리(Beckman Coulter, Brea, CA, USA)한 후 상등액을 조효소원으로 사용하였다. 조효소원의 총 단백질 함량은 bicinchoinic acid(BCA) protein assay kit(Thermo, Rockford, IL, USA)를 이용하여 측정하였다. 검정곡선을 작성하기 위한 bovine serum albumin(BSA) 표준용액 0, 0.1, 0.25, 0.5 및 1 mg/mL과 시료 옥수수 및 현미 조효소원을 각각 96 well plate에 10 µL씩 넣었다. BCA protein assay reagent A 및 B 혼합 용액을 200 µL씩 첨가하고, 37°C에서 30분간 반응시킨 후, 550 nm 파장에서 spectrometer로 흡광도를 측정하였다. BSA 표준용액의 농도와 흡광도 값으로부터 작성된 검정곡선을 이용하여 조효소원의 총 단백질 함량을 산출하였다.

옥수수와 현미로부터 제조한 조효소원의 효소 활성도를 평가하기 위하여 조효소원과 T-2 독소를 반응시킨 후 시간 별로 분석하였다. 옥수수와 현미의 조효소원 30 mL(100 mg 단백질)에 T-2 독소 200 µg/kg 농도를 첨가하고 shaking incubator를 사용하여 25°C에서 반응시켰다. 각각 7.5, 15, 30, 60, 90 및 120분 반응 후 효소 반응액 2 mL을 취하고 동량의 methanol을 이용해 carboxylesterase의 활성을 중지시킨 후, GC 및 LC를 이용하여 T-2와 HT-

2 독소 함량을 분석함으로써 효소 활성도를 평가하였다. 이하 모든 실험은 독립적으로 3회 반복하였다.

효소의 불활성화

옥수수과 현미 시료에 존재하는 carboxylesterase를 불활성화 시켰을 때 T-2 독소의 탈아세틸화에 미치는 영향을 평가하기 위하여, 시료를 autoclave 처리하여 효소를 불활성화 시킨 후 분석하였다. Autoclave는 121°C에서 20분 동안 처리하는 조건을 사용하여 효소를 불활성화시켰다. 효소를 불활성화 시킨 시료와 불활성화 시키지 않은 시료 10g에 각각 T-2 독소 200 µg/kg을 첨가하고, 30 mL PBS와 섞어준 후 incubator에서 25°C, 30분 동안 반응시켰다. 30분 뒤, methanol을 이용해 추출한 후 추출액은 여과지(Whatman No. 1)로 여과하여 증류수로 5배 희석시켰다. 단백질 침전을 위해 10분 동안 방치시킨 다음 3분 동안 흔들어서 주고 다시 5분 동안 방치하였다. 그리고 GF/B 여과지로 여과하고 여과액을 초당 1방울의 속도로 먼역친화컬럼에 통과시켰다. 여과액이 통과되면 먼역친화컬럼을 증류수로 세척하고 공기를 주입하여 건조시켰다. 독소는 2.5 mL acetonitrile로 유출시켰다. 마지막으로 유출된 용액을 1 mL씩 취해 바이알에 담은 후 1개는 GC-ECD (electron capture detector) 분석을 위한 유도체반응을, 1개는 HPLC-FLD(fluorescence detector) 분석을 위한 유도체반응을 실시한 후 GC 및 HPLC 시험용액으로 사용하였다. 이 때 유도체 반응은 HPLC의 경우 먼역친화컬럼을 통과시킨 추출액(1 mL)을 N₂ 가스를 이용하여 건조시킨 다음, 유도체 시약 1-AN과 반응촉매제 4-DMAP를 100 µL씩 넣고 heating block에서 50°C, 15분 동안 반응시켰다. GC의 경우 먼역친화컬럼을 통과 시킨 추출액(1 mL)을 N₂ 가스를 이용하여 건조시킨 다음, 유도체 시약 TFAA(200 µL)와 반응촉매제 NaHCO₃(15 mg)를 넣고 heating block에서 80°C, 30분 동안 반응시켰다. 이 외에 PBS를 첨가/반응 시키지 않은 시료는 대조구로 전 과정을 동일하게 분석한 후 비교 및 평가하였다. 이하 모든 실험은 독립적으로 3회 반복하였다.

추출 용매 및 추출 방법

분석 과정 중 시료에 존재하는 carboxylesterase에 의한 T-2 독소의 탈아세틸화가 추출 용매 및 추출 방법에 따라 분석치에 어떠한 영향을 미치는지를 살펴보기 위해 2가지 추출 방법을 적용하여 3회씩 독립적인 반복 실험을 수행하였다. 첫 번째 추출 방법은 T-2와 HT-2 독소만을 분석하는 방법으로 이들 독소의 분석 시 비교적 많이 사용되는(4,5,16,17) methanol/water 80:20을 적용한 방법이다. 두 번째 추출 방법은 T-2와 HT-2 독소를 포함한 수용성 및 지용성 곰팡이독소의 동시 분석을 위한 방법으로 수용성 독소를 추출하거나 먼역친화컬럼에 적용하기 위해 희석용액이나 세척용액으로 많이 사용하는(17,18) PBS를 이용하여 먼저 추출한 후 methanol로 한번 더 추출하는 방법이다. 이 때 추출 용매 및 추출 방법과 더불어 carboxylesterase에 의한 영향을 동시에 살펴보기 위해 시료에 존재하는 효소를 불활성화 시킨 시료와 불활성화 시키지 않은 시료로 구분하여 실험하였다. 먼저, 시료 10g에 각각 T-2 독소 50 µg/kg과 200 µg/kg을 첨가한 후 실온에서 하루 동안 방치하였다. T-2와 HT-2 독소만을 분석하기 위한 첫 번째 추출방법의 경우, 효소를 불활성화 시키지 않은 시료를 사용하였고, 80% methanol을 이용하여 추출한 후 No. 1 여과지로 여과하였다. 여과액은 4% NaCl을 이용하여 희석시켰고, GF/B 여과지로 여과한 후 먼역친화컬럼에 통과시켰다. 2.5 mL acetonitrile로 최종 유출시키고 GC 및 HPLC 유도체반응을 한 후, 각각을 GC 및 HPLC 시험용액으로 사용하였다. 수용성 및 지용

성 곰팡이독소의 동시 분석을 위한 두 번째 방법의 경우, 효소를 불활성화 시킨 시료와 불활성화 시키지 않은 시료 각각에 50 mL PBS를 넣고 균질기(Ultra-Turrex, IKA, Staufen, Germany)를 이용하여 추출한 후 20분 동안 4500×g, 4°C의 조건에서 원심분리 하였다. 상등액 35 mL은 No. 1 여과지로 여과하였고, 상등액을 취하고 남은 하층액은 80% methanol을 이용하여 추출한 것과 동일하도록 methanol을 첨가하여 다시 추출한 후 여과하였다. 여과된 상등액과 하층액을 섞은 후 4% NaCl을 이용하여 3배 희석시킨 후 단백질 침전을 위해 10분 동안 방치시킨 다음 3분 동안 흔들어 주고 다시 5분 동안 방치하였다. 그리고 GF/B 여과지로 여과하고 여과액을 초당 1방울의 속도로 먼역친화컬럼에 통과시켰다. 독소는 2.5 mL acetonitrile로 최종 유출시킨 다음 앞서 기술한 동일한 방법으로 GC 및 HPLC 유도체반응을 한 후, 각각을 GC 및 HPLC 시험용액으로 사용하였다.

GC 및 HPLC 분석

GC분석은 Agilent(Santa Clara, CA, USA)사의 7890A series를 사용하였고, 검출기로 electron capture detector(ECD)를 사용하였다. 컬럼은 DB-17 ms(30 m×0.25 mm×0.15 µm)를 사용하였고, 시료 주입은 splitless mode로 2 µL를 주입하였다. 이동상 가스는 He, 메이 크업 가스는 N₂를 사용하였다. HPLC 분석은 Jasco(Tokyo, Japan)사의 PU-2089, AS-2051, CO-2060 및 FP-2020을 사용하였다. 컬럼은 Luna Phenyl-Hexyl column(150 mm×4.6 mm I.D., 5 µm)을 사용하였고, 컬럼온도는 40°C, 주입량은 50 µL로 하였다. 이동상의 유속은 1 mL/min으로 하였고, 용매조성은 acetonitrile과 증류수의 조성이 70:30으로 5분 동안 유지된 후 10분 동안 용매 조성을 85%로 증가시켜 10분 동안 유지하였다. 이어 2분 동안 용매 조성을 100%로 올린 후, 5분 동안 85%로 감소시켰다. 3분 동안 초기상태(70%)로 감소시킨 후, 컬럼의 평형을 유지하기 위해 초기상태에서 10분 동안 유지하였다. 검출기는 형광검출기를 이용하였고 excitation 파장은 381 nm, emission 파장은 470 nm로 하였다.

결과 및 고찰

옥수수와 현미에서 제조한 carboxylesterase 조효소원의 활성도 평가

옥수수와 현미로부터 제조한 조효소원과 T-2 독소를 25°C에서 반응시키며 7.5, 15, 30, 60, 90 및 120분 경과 시 효소 반응액을 취한 다음 T-2와 HT-2 독소를 분석하였다. 그 결과 백분율로 비교했을 때 옥수수 시료에서 15분 이내에 T-2 독소는 20%로 급격히 감소한 반면 HT-2 독소는 84%로 증가하였다. 30분 이후에 T-2 독소는 13%로 감소한 후 일정하게 유지되었고 HT-2 독소는 93%로 증가한 후 일정하게 유지되었다. 현미 시료에서 T-2 독소는 15분 이내에 21%로 급격히 감소한 반면 HT-2 독소는 86%로 증가하였고, 30분 이후에 T-2 독소는 검출되지 않은 반면 HT-2 독소는 95%로 증가한 후 유지되는 것으로 나타났다(Fig. 2). Fig. 3은 T-2와 HT-2 독소의 표준용액(A, D), 옥수수와 현미 시료에서 추출한 조효소원과 T-2 독소의 반응액을 초기 상태(B, E)와 30분 후(C, F) 시료를 취하여 HPLC와 GC로 분석한 크로마토그램이다. HPLC로 분석하였을 경우 T-2 독소는 9.0 min, HT-2 독소는 18.7 min에 검출되었고(A, B, C), GC로 분석하였을 경우 T-2 독소는 12.0 min, HT-2 독소는 11.3 min에 검출되었다(D, E, F). Fig. 2와 3에 나타난 결과로부터 옥수수와 현미 시료에서 추출한 조효소원과 T-2 독소가 반응하여 HT-2 독소로 전환된 것이 확인된다. Lattanzio 등(14)에 따르면 T-2 독소의 carboxylesterase의 활성

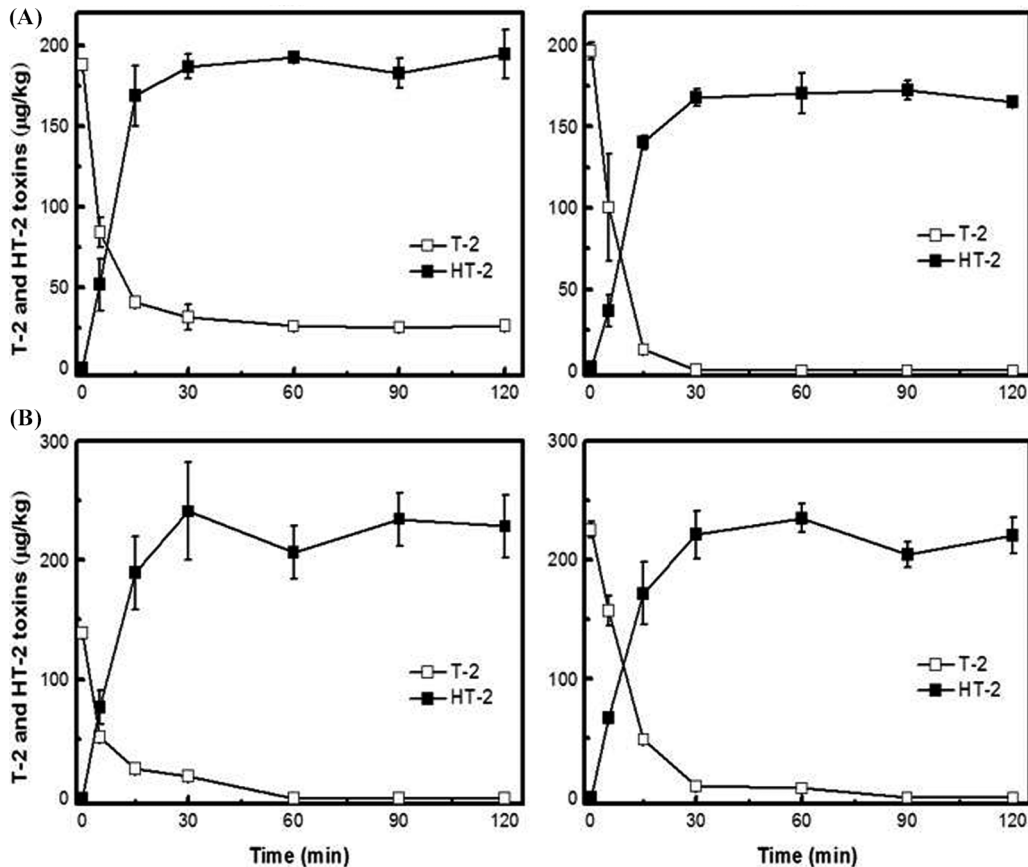


Fig. 2. Time course of conversion of T-2 toxin into HT-2 toxin spiked at 200 µg/kg T-2 toxin in (A) corn protein extracts and (B) brown rice protein extracts.

을 옥수수, 보리, 밀 및 귀리의 시료에서 확인한 결과, 가수분해 정도는 시료마다 다르게 나타났으나, T-2 독소가 탈아세틸화되어 HT-2 독소로 전환되었다. 이와 같은 결과는 본 연구와 유사한 결과 값을 보여 주었다. 동물의 장기(19-21)나 *Fusarium*속 곰팡이(22,23)의 조추출액에서도 탄소 3번 위치와 탄소 4번 위치에서 T-2 독소의 탈아세틸화와 관련된 carboxylesterase가 보고되었다.

효소 불활성화에 의한 T-2 독소의 탈아세틸화

옥수수와 현미 시료에 존재하는 carboxylesterase를 불활성화 시켰을 때 T-2 독소의 탈아세틸화에 미치는 영향을 평가하기 위하여 시료를 autoclave 처리하여 효소를 불활성화 시킨 다음 HPLC와 GC로 T-2와 HT-2 독소를 분석하였다. T-2와 HT-2 독소는 autoclave 조건 온도 121°C에서 안정적이기 때문에(8) 효소 변성만을 유도할 수 있어 본 실험에 적용하였다. 또한 본 연구에서 효소의 안정화를 위해 PBS에서 30분 반응시키는 조건을 사용했기 때문에 PBS의 영향을 고려하여 PBS상에서 반응시키지 않은 대조군 시료를 병행하여 분석하였다. 그 결과, T-2 독소의 회수율이 옥수수 시료에서 80-83%, 현미 시료에서 87-98%로 양호하였고 HT-2 독소는 검출되지 않았다. PBS를 첨가하고 30분간 반응시킨 후 분석하였을 때는 시료에 존재하는 효소의 불활성화 여부에 따라 다른 양상을 나타내었다. 우선, 효소를 불활성화 시킨 시료에 T-2 독소 200 µg/kg을 첨가하였을 경우에는 옥수수 시료에서 T-2 독소의 회수율이 60-68%, 현미 시료에서 98-107%를 나타내었으나 HT-2 독소는 검출되지 않았다. 반면, 효소를 불활성화 시키지 않은 시료에 T-2 독소 200 µg/kg을 첨가하였을 경우에

는 옥수수 시료에서 T-2 독소의 회수율이 0-9%로 감소하였고 HT-2 독소는 77-121% 수준으로 증가하였다. 현미 시료에서도 T-2 독소의 회수율이 0-6%로 감소하였고 HT-2 독소는 77-80% 수준으로 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 4). 이를 통해 PBS상에서 반응시키지 않은 경우에는 시료에 존재하는 carboxylesterase의 영향을 받지 않았지만, PBS에서 반응시킨 경우에는 시료에 존재하는 carboxylesterase의 영향을 받아 T-2 독소가 탈아세틸화되어 HT-2 독소가 형성되는 것을 확인할 수 있었다. 시료에 존재하는 carboxylesterase를 불활성화 시켰을 때는 PBS상에서 반응하더라도 T-2 독소의 탈아세틸화가 관찰되지 않았다. 이로부터 분석과정 중에 PBS를 사용하는 단계가 있다면 현미나 옥수수 시료에 존재하는 carboxylesterase에 의해 T-2가 HT-2 독소로 전환되어 T-2 및 HT-2 독소를 각각 정량분석할 때 분석치에 영향을 미칠 수 있을 것으로 사료된다.

추출 용매 및 추출 방법에 따른 T-2 독소의 탈아세틸화

분석 과정 중 시료에 존재하는 carboxylesterase에 의한 T-2 독소의 탈아세틸화가 추출 용매 및 추출 방법에 따라 분석치에 어떠한 영향을 미치는지를 살펴보기 위해 autoclave로 효소를 불활성화 시킨 시료와 불활성화 시키지 않은 시료에 대해 두 가지 추출 방법을 적용하여 HPLC와 GC로 T-2와 HT-2 독소를 분석한 결과를 비교·평가하였다.

첫째, T-2와 HT-2 독소만을 분석하는 방법으로 이들 독소를 분석할 경우에 비교적 많이 사용되는(4,5,16,17) 추출용매(methanol/water, 80:20)를 적용했을 때, 효소를 불활성화 시키지 않은 옥수

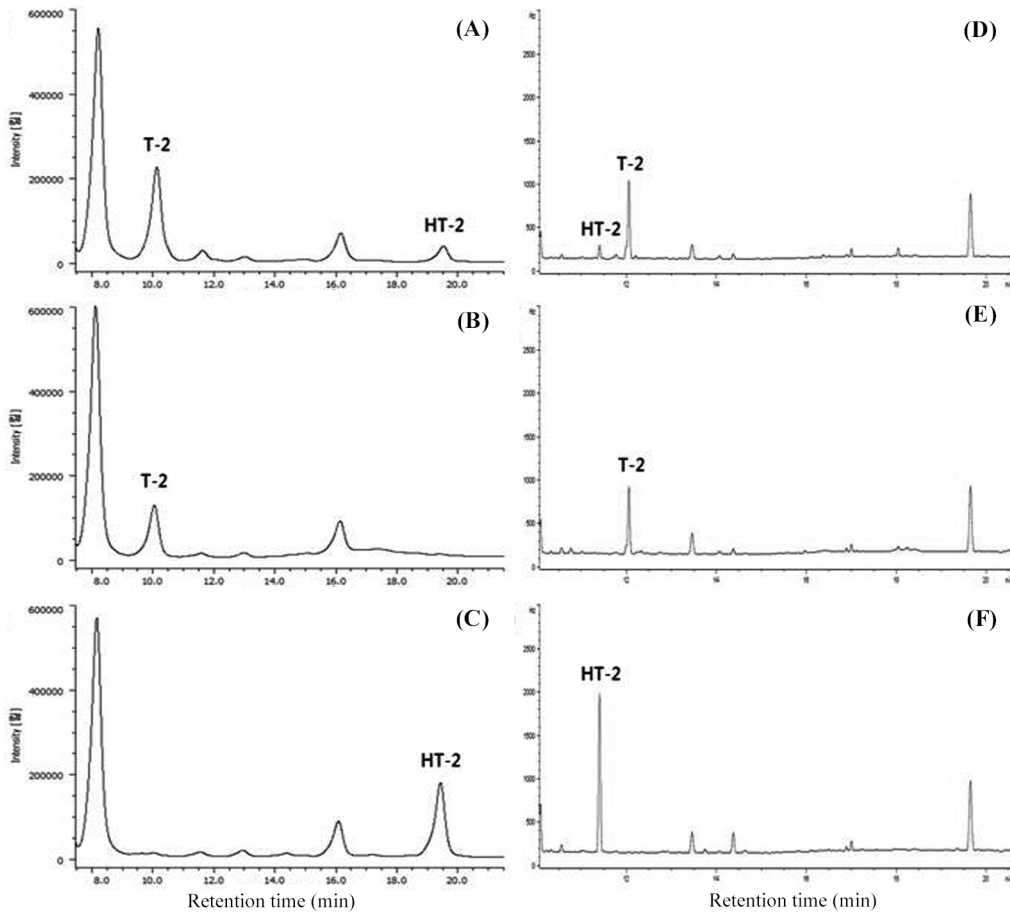


Fig. 3. Representative chromatograms of (A) T-2 and HT-2 toxin standards by HPLC-FLD, (B) T-2 toxin in corn spiked at 200 µg/kg by HPLC-FLD, (C) the complete disappearance of T-2 toxin and appearance of HT-2 toxin after 30 min in corn by HPLC-FLD, (D) T-2 and HT-2 toxin standards by GC-ECD, (E) T-2 toxin in brown rice spiked at 200 µg/kg by GC-ECD and (F) the complete disappearance of T-2 toxin and appearance of HT-2 toxin after 30 min in brown rice by GC-ECD.

수 시료에서는 T-2 독소만 검출되었으며, 그 회수율은 86-100% 이었다. 효소를 불활성화 시키지 않은 현미 시료에서도 T-2 독소만 검출되었으며, 그 회수율은 84-105%을 나타내었다.

둘째, 곰팡이독소의 동시 분석을 위한 방법으로 PBS를 이용하여 먼저 추출한 다음 methanol로 한번 더 추출하는 방법을 적용했을 때, 효소를 불활성화 시킨 옥수수 시료에서는 T-2 독소가 62-87% 수준으로 검출되었으나 HT-2 독소는 검출되지 않았다. 반면, 효소를 불활성화 시키지 않은 옥수수 시료에서는 T-2 독소가 2-9% 수준으로 검출되거나 검출되지 않았으나 HT-2 독소는 37-59% 수준으로 검출되었다(Table 1). 효소를 불활성화 시킨 현미 시료에서는 PBS와 methanol을 사용한 추출방법을 적용한 경우 T-2 독소가 60-87% 수준으로 검출되었으나 HT-2 독소는 검출되지 않았다. 반면, 효소를 불활성화 시키지 않은 현미 시료에서는 PBS와 methanol을 사용한 추출방법을 적용한 경우 T-2 독소가 5-8% 수준으로 검출되거나 검출되지 않았으나 HT-2 독소는 39-66% 수준으로 검출되었다(Table 2).

이러한 결과들은 T-2 독소가 현미나 옥수수에 존재하는 carboxylesterase에 의해 탈아세틸화되어 HT-2 독소로 전환된다는 것을 시사한다. 한편, 효소를 불활성화 시키지 않은 옥수수나 현미 시료에서 검출된 HT-2 독소의 수준이 37-66%로 비교적 낮게 나타난 것으로 보아 T-2 독소가 시료 중에 존재하는 carboxylesterase에 의해 HT-2 독소 외에도 다른 대사산물로 전환되었을 가능성

을 배제할 수 없다고 사료된다. 본 연구 결과로부터 trichothecenes 동시분석을 위해 PBS 및 methanol을 사용하는 2단계 추출방법을 적용한다면 시료에 존재하는 carboxylesterase의 불활성화 여부가 T-2 독소의 분석치에 영향을 미칠 것으로 보인다. Lattanzio 등(18)도 11종 곰팡이독소를 동시에 분석하기 위해 2단계 추출을 실시하였다. 첫 번째 추출용매로 PBS를 사용하여 추출한 결과, T-2 독소와 HT-2 독소의 회수율은 각각 0%와 180%로 나타났다. 반면 methanol을 첫 번째 추출용매로 사용하면 72-97% 회수율을 나타내었다. 추출용매로 methanol/water을 사용했을 때 T-2 독소가 탈아세틸화되어 HT-2 독소로 전환되지 않는 현상은 methanol이 효소 변성을 일으키기 때문이라고 하였다(22).

현재 EU나 국내의 경우 T-2와 HT-2 독소에 대한 식품 중 기준치가 설정되어 있지 않지만, 약 10개국에서 식품 중 기준치를 설정하여 관리하고 있다(24). T-2와 HT-2 독소를 합으로 규제하는 국가도 있으나, T-2 독소만 규제하는 국가가 대부분이다. T-2와 HT-2 독소를 합으로 규제하는 국가에서는 T-2 독소 탈아세틸화의 영향이 T-2와 HT-2 독소를 분석할 때 문제가 되지 않을 수 있지만, T-2 독소만 규제하는 국가나 T-2와 HT-2 독소를 각각 정량분석해야 할 경우에는 T-2 독소의 탈아세틸화로 인한 HT-2 독소로의 전환이 분석치에 영향을 미칠 수 있을 것으로 사료된다.

따라서 T-2와 HT-2 독소 및 다른 곰팡이독소를 동시에 분석하기 위해 추출용매로 PBS를 사용할 때는 옥수수와 현미 시료에

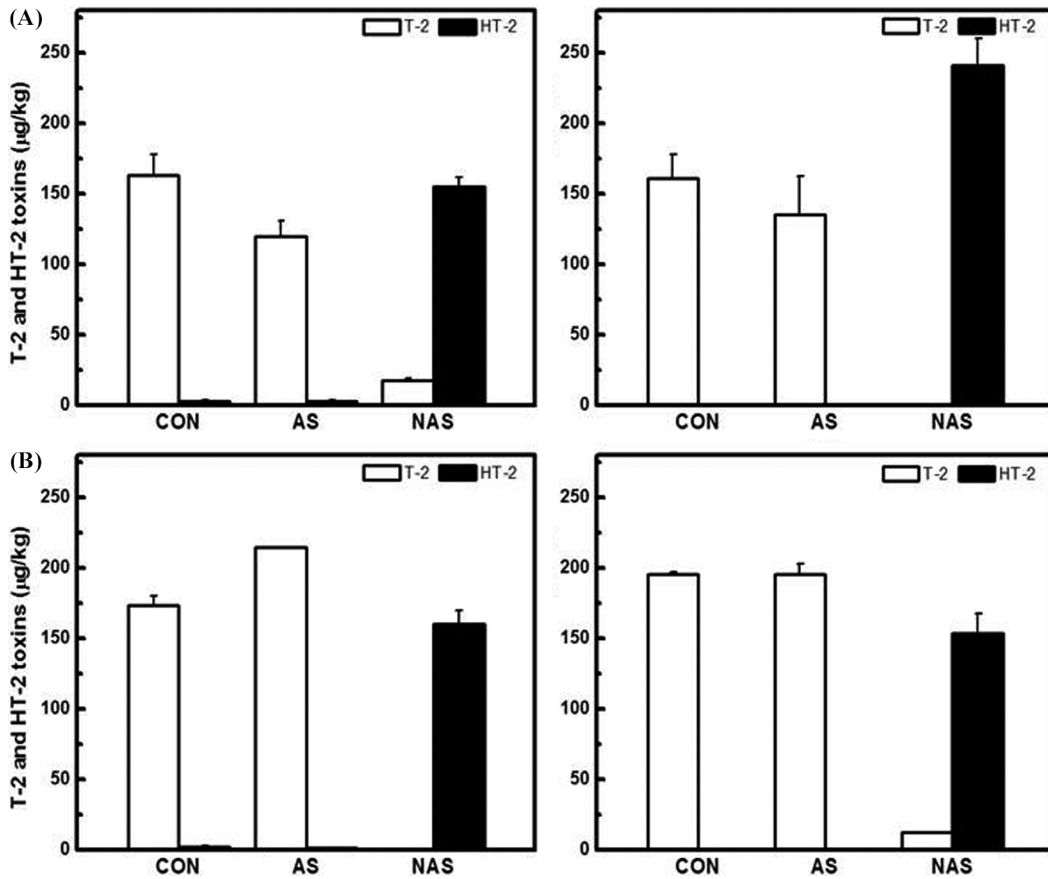


Fig. 4. Effect of autoclaving on the conversion of T-2 toxin into HT-2 toxin spiked at 200 µg/kg T-2 toxin in (A) corn and (B) brown rice (CON: control, AS: autoclaved samples, NAS: non-autoclaved samples). Data were compiled from three independent experiments. Each was done in triplicate.

Table 1. Recoveries of T-2 and HT-2 toxin by different extraction procedures in autoclaved and non-autoclaved corn spiked with T-2 toxin

Level of T-2 toxin spiked (µg/kg)	Method	Toxin	Recovery±RSD (%) ¹⁾		
			NAS ²⁾		AS ³⁾
			MeOH/H ₂ O 80:20 extraction ⁴⁾	Double extraction ⁴⁾	Double extraction
50	HPLC	T-2	86±16	0	62±30
		HT-2	0	42±27	0
	GC	T-2	88±10	0	74±4
		HT-2	0	37±34	0
200	HPLC	T-2	100±8	9±9	77±14
		HT-2	0	56±28	0
	GC	T-2	87±37	8±15	87±24
		HT-2	0	59±6	0

¹⁾Data were compiled from three independent experiments. Each was done in duplicate.
²⁾NAS: non-autoclaved samples
³⁾AS: autoclaved samples
⁴⁾Double extraction: double extraction performed with methanol/water 80:20 followed by PBS.

Table 2. Recoveries of T-2 and HT-2 toxin by different extraction procedures in autoclaved and non-autoclaved brown rice spiked with T-2 toxin

Level of T-2 toxin spiked (µg/kg)	Method	Toxin	Recovery±RSD (%) ¹⁾		
			NAS ²⁾		AS ³⁾
			MeOH/H ₂ O 80:20 extraction ⁴⁾	Double extraction ⁴⁾	Double extraction
50	HPLC	T-2	91±11	0	64±12
		HT-2	0	39±22	0
	GC	T-2	84±14	5±6	87±14
		HT-2	0	63±28	0
200	HPLC	T-2	93±10	8±7	68±11
		HT-2	0	60±18	0
	GC	T-2	103±45	8±5	60±1
		HT-2	0	66±26	0

¹⁾Data were compiled from three independent experiments. Each was done in duplicate.
²⁾NAS: non-autoclaved samples
³⁾AS: autoclaved samples
⁴⁾Double extraction: double extraction performed with methanol/water 80:20 followed by PBS.

존재하는 carboxylesterase에 의한 T-2 독소의 탈아세틸화를 고려해야 할 것이다. 본 연구에서 시도한 방법이, 즉 시료 중 효소활성을 autoclave에 의해 불활성화시킨 다음 분석하는 것이 정확성을 높이는 일종의 대응방안이 될 수 있을 것이라 사료되나 가장

경제적인 방안을 모색하는 추가적인 연구가 요구된다. 또한 T-2와 HT-2 독소를 합으로 평가할 때에도 효소의 불활성화 여부와 추출용매 및 추출방법 등을 함께 고려하여 연구목적에 맞는 분석 방법이 적절하게 선택되어야 하겠다.

요 약

T-2와 HT-2 독소는 type A trichothecene계 곰팡이독소에 속하는 식품 오염물질이나, 국내의 경우 기준치 설정과 분석법의 확립이 요구되고 있다. 본 연구에서는 T-2와 HT-2 독소의 분석법 확립에 도움이 되고자 옥수수수와 현미 시료에 존재하는 carboxylesterase에 의한 T-2 독소의 탈아세틸화가 GC 및 HPLC에 의한 T-2와 HT-2 독소 분석치에 미치는 영향을 살펴보았다. 옥수수수와 현미 시료로부터 제조된 carboxylesterase 조효소원에 의한 T-2 독소의 HT-2 독소로의 전환 정도를 살펴본 결과, 15분 이내에 84-86%의 HT-2 독소가 급격히 형성되었고, 30분 이후에는 93-95%로 증가한 후 일정하게 유지되었다. 시료에 존재하는 효소의 불활성화 여부가 분석치에 미치는 영향을 살펴보면, 효소를 불활성화 시킨 시료에서는 T-2 독소가 60-107% 검출되었고 HT-2 독소가 검출되지 않은 반면, 효소를 불활성화 시키지 않은 시료에서는 T-2 독소가 0-9% 검출되었고 HT-2 독소가 77-121% 생성되었다. 추출용매 및 추출방법에 따른 T-2 독소의 탈아세틸화를 살펴본 결과, methanol/water 80:20으로 추출한 경우에는 T-2 독소가 84-108% 검출되었다. 곰팡이독소의 동시분석을 위해 PBS로 1차 추출한 다음 methanol로 추출할 때, 효소를 불활성화 시킨 시료에서는 T-2 독소가 60-87% 검출되었고 HT-2 독소가 검출되지 않았다. 반면, 효소를 불활성화 시키지 않은 시료에서는 T-2 독소가 검출되지 않았고 HT-2 독소가 37-66% 생성되었다. 이러한 결과는 옥수수수와 현미 시료에 존재하는 carboxylesterase에 의해 T-2 독소가 탈아세틸화되어 T-2와 HT-2 독소를 각각 정량분석할 때 분석치에 영향을 미칠 수 있다는 것을 시사한다.

감사의 글

이 논문은 2011년도 교육과학기술부의 재원으로 한국연구재단-공공복지안전사업(#2011-0020982)의 지원과 한국식품연구원의 기관주요사업의 지원을 받아 수행된 연구로 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Lee HK, Hwang HH, Kim MJ, Kim MK, Lee SE, Lee HS. Review: Toxicity and metabolism of mycotoxins occurring in foods and feeds. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* 45: 1-10 (2002)
2. Song HH, Kim J, Lee C. A review of mycotoxins from *Fusarium* species. *Safe Food* 1: 19-28 (2006)
3. Sudakin DL. Trichothecenes in the environment: Relevance to human health. *Toxicol. Lett.* 143: 97-107 (2003)
4. Li Y, Wang Z, Beier RC, Shen J, Smet DD, Saeger SD, Zhang S. T-2 toxin, a trichothecene mycotoxin: Review of toxicity, metabolism, and analytical methods. *J. Agr. Food Chem.* 59: 3441-3453 (2011)
5. Razzazi-Fazeli E, Rabus B, Cecon B, Bohm J. Simultaneous quantification of A-trichothecene mycotoxins in grains using liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 968: 129-142 (2002)
6. Yoshizawa T, Kohno H, Ikeda K, Shinoda T, Yodohama H, Morita K, Kusada O, Kobayashi YA. Practical method for mea-

- asuring deoxynivalenol, nivalenol, and T-2 + HT-2 toxin in foods by and enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies. *Biosci. Biotech. Bioch.* 68: 2076-2085 (2004)
7. Schlatter J. Toxicity data relevant for hazard characterization. *Toxicol. Lett.* 153: 83-89 (2004)
8. JECFA, T-2 and HT-2 toxins. WHO Food Additives Series 47, WHO. Available from: in <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je06.htm> Accessed Jan. 12, 2012.
9. Tritscher AM, Page SW. The risk assessment paradigm and its application for trichothecenes. *Toxicol. Lett.* 153: 155-163 (2004)
10. Visconti A. Problems associated with *Fusarium* mycotoxins in cereals. *Bulletin of the Institute for Comprehensive Agricultural Sciences, Kinki University* 9: 39-55 (2001)
11. Meneely JP, Ricci F, van Egmond HP, Elliott CT. Current methods of analysis for the determination of trichothecene mycotoxins in food. *Trends Anal. Chem.* 30: 192-203 (2011)
12. EFSA. Scientific report submitted to EFSA - Report on toxicity data on trichothecene mycotoxins HT-2 and T-2 toxins (CT/EFSA/CONTAM/2010/03), Prepared by Ulrike Schuhmacher-Wolz, Karin Heine, Klaus Schneider, Forschungs-und Beratungsinstitut Gefahrstoffe GmbH (FoBiG), Freiburg, Germany (2010)
13. Dohnal V, Jezkova A, Jun D, Kuca K. Metabolic pathways of T-2 toxin. *Curr. Drug Metab.* 9: 77-82 (2008)
14. Lattanzio VMT, Solfrizzo M, Visconti A. Enzymatic hydrolysis of T-2 toxin for the quantitative determination of total T-2 and HT-2 toxins in cereals. *Anal. Bioanal. Chem.* 395: 1325-1334 (2009)
15. Gershtater M, Sharples K, Edwards R. Carboxylesterase activities toward pesticide esters in crops and weeds. *Phytochemistry* 67: 2561-2567 (2006)
16. Lattanzio VMT, Gatta SD, Suman M, Visconti A. Development and in-house validation of a robust and sensitive solid-phase extraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the quantitative determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2, ochratoxin A, deoxynivalenol, zearalenone, T-2, and HT-2 toxins in cereal-based foods. *Rapid Commun. Mass Sp.* 25: 1869-1880 (2011)
17. Lattanzio VMT, Solfrizzo M, Visconti A. Determination of trichothecenes in cereals and cereal-based products by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Addit. Contam.* 25: 320-330 (2008)
18. Lattanzio VMT, Solfrizzo M, Powers S, Visconti A. Simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A, and *Fusarium* toxins in maize by liquid chromatography/tandem mass spectrometry after multitoxin immunoaffinity cleanup. *Rapid Commun. Mass Sp.* 21: 3253-3261 (2007)
19. Ohta M, Ishii K, Ueno Y. Metabolism of trichothecene mycotoxins. I. Microsomal deacetylation of T-2 toxin in animal tissues. *J. Biochem.* 82: 1591-1598 (1977)
20. Ohta M, Matsumoto H, Ishii K, Ueno Y. Metabolism of trichothecene mycotoxins. II. Substrate specificity of microsomal deacetylation of trichothecenes. *J. Biochem.* 84: 697-706 (1978)
21. Visconti A, Mirocha CJ. Identification of various T-2 toxin metabolites in chicken excreta and tissues. *Appl. Environ. Microb.* 49: 1246-1250 (1985)
22. Park JJ, Chu FS. Partial purification and characterization of an esterase from *Fusarium sporotrichioides*. *Nat. Toxins* 4: 108-116 (1996)
23. McCormick SP, Alexander NJ. *Fusarium* Tri8 encodes a trichothecene C-3 esterase. *Appl. Environ. Microb.* 68: 2959-2964 (2002)
24. FAO. Worldwide regulation for mycotoxins in food and feed in 2003. A compendium. FAO food and nutrition paper n. 81, FAO, Rome, Italy (2003)