Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 20, No. 3, 355-361 (1992)

수입곡물 중의 Aflatoxin B_1 검출을 위한 효소면역측정법의 평가

손동화* · 박애란 · 이인원
농업생물신소재연구센터, 서울대학교 농업생명과학대학

Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Aflatoxin B_1 from the Imported Cereals

Shon, Dong-Hwa*, Ae-Ran Park and Yin-Won Lee
Research Center for New Bio-Materials in Agriculture,
College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

Abstract — In order to evaluate an enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) for practical use in detecting aflatoxin B_1(AFB_1) from cereals, we compared AFB_1 concentrations of samples contaminated artificially or naturally that were quantitated by the ELISA with those spiked or quantitated by HPLC. Cotton seed meals(19 items), rape seed meals(11), soybean meals(9), and corns(3) imported from foreign countries were used as sample cereals. The standard curves of each cereal class showed that 1~100 ng/g of AFB_1 from cereals could be assayed by the ELISA. When artificially contaminated cereals were assayed by ELISA, the average recovery of AFB_1 from samples spiked to 3 ng/g and more was 138%(68~193%), although that spiked to 1 ng/g was somewhat high(268%). The average C.V. of recovery was 7.0%(0~22.2%). When naturally contaminated cereals were assayed, the concentrations of AFB_1 below 10 ng/g especially from rape seed meals quantitated by ELISA were much lower than those determined by HPLC. However, the concentrations of 10 ng/g and more from samples, except a few extraordinary samples, quantitated by ELISA were similar to those determined by HPLC, especially in case of cotton seed meals whose average recovery (ELISA/HPLC) was 153%. In conclusion, the ELISA was elucidated such as a practical tool to detect AFB_1 of 10 ng/g and more from cereals.

우리나라는 1980년부터 농산물의 수입량이 꾸준히 증가하여 옥수수, 소맥, 콩 등을 포함한 곡물의 수입 금액이 1990년 현재 20억불을 초과하였으며 앞으로 UR농산물협정이 타결될 경우 그 수입량이 급격히 증가할 것으로 예상된다. 이에 따라 잔류농약이나 진균독소의 오염으로 인한 안전성문제가 대두되고 있다. 그러므로 수입곡물 중의 유해물질검사에 만전을 기하여야 한다. 그러나, 기존의 이화학적 분석법으로는 많은 시료 중에 존재하는 여러 종류의 유해물질을 검출하기에는 분석인력, 장비, 예산 면에서 어려움이 많은 실정이다(11, 12).

따라서, 이 문제를 해결하기 위한 방안의 하나로 새로운 검출법의 활용이 절실히 요구된다. 이에 구미 선진국에서는 분석방법이 개발되어 최근에 점차 실용화되고 있는 효소면역측정법을 도입함이 바람직하다고 하겠다(13, 17). 이 방법은 항체의 특이성을 이용하므로써 감도가 높고, 신속, 정확, 간편하며, 경제적이다. 단지, 이화학적 방법과는 달리 한번의 분석으로 한 종류의 유해성분만을 검출할 수 있다는 단점이 있다. 그러나, 효소면역측정법은 많은 유기용매를 사용하지 않으므로 환경오염의 우려가 적으며 분석의 전문성을 그다지 요하지 않고 시료의 전처리가 간편하다. 그러므로 이 분석법은 일 회에 수 백개의 시료를 처리할 수 있는 매우 효율적인 방법으로 알려져 있다. 이러한 효소면역측정법으로 유해물질의

Key words: ELISA evaluation, aflatoxin B_1, imported cereals
*Corresponding author/Present address: Division of Food Science, Korea Food Research Institute, Songnam 463-420, Korea

검출을 할 수 있도록 개발된 kit는 미국의 ImmunoSystem, Inc.(Scarborough, ME) 등에서 상품화하여 판매하고 있으나, 많은 시료의 처리시는 막대한 경비가 소요될 것으로 예상된다. 따라서 국내에서 연구가 미비한 이 분야의 기술을 조속히 개발, 보급하여 이 검출법을 실용화할 필요가 있다.

한편, aflatoxin(특히 B_1)은 맹독성과 발암성 때문에 인축에 치명적인 중독증을 초래할 가능성이 있는 곡물중의 대표적인 유해물질이어서, 공중보건위생과 가축의 생산성 향상을 위하여 특별히 그 안전성을 제고할 필요가 있다(3). 특히 aflatoxin의 자연발생은 전세계적으로 고온다습한 열대나 아열대 지방에서 생산되는 곡류에서 빈번하기 때문에 한국산 농산물은 비교적 안전하며 수입곡물이 훨씬 문제의 소지가 많다. 따라서 본 연구에서는 여러 유해물질 가운데서 우선 aflatoxin B_1(AFB_1)을 검출대상으로, 효소면역측정법(ELISA)에 의한 수입곡물 시료의 분석을 시도하였다. 즉, 다클론항체임에도 불구하고 유사독소와의 교차반응이 비교적 적고 항체가가 매우 높은 항AFB_1 항체를 이용하여 전보(15)에서 개발한 AFB_1 분석방법(direct competitive ELISA)이 실제 곡물시료의 분석에 활용가능한지를 검토하기 위하여, 면실박 등 수입곡물중의 ELISA 분석치를 인위적인 오염치 및 자연오염된 시료의 HPLC 분석치와 비교하였다.

재료 및 방법

재료

AFB_1, Tween 20, 2,2′-azinobis(3-ethylbezthiazoline sufonic acid(ABTS)) 등은 Sigma사의 제품을 이용하였고, 항AFB_1 항체 및 AFB_1-1-(O-carboxymethyl)oxime-horseradish peroxidase(AFB_1-HRP)는 전보 등에서와 같은 방법으로 준비하여 사용하였다(5, 6, 15). Acetonitrile, $CHCl_3$, *n*-hexane, methanol (MeOH), trifluoroacetic acid(TFA) 등 기타 시약은 GR을 사용하였다. Microtiter plate는 Nunc사의 MaxiSorp®를, microplate reader는 Flow Lab사의 Multiskan MCC/340 P를 사용하였다.

곡물시료

곡물시료는 1991년 1월부터 10월까지 국내의 곡물 및 사료회사들로부터 외국산 소맥, 옥수수, 면실박 등 9종류, 116시료를 수집하였다. 이중에서 AFB_1의 오염이 확인된 면실박, 채종박, 대두박, 옥수수 등 약 40점의 시료를 중심으로 분석에 사용하였다.

효소면역측정법(ELISA)

전보에서 확립한 직접법(direct competitive ELISA)에 의하여 분석하였다(15). 즉, coating buffer(0.02 M tris, 0.15 M NaCl, pH 9.0)에 1/5,000로 희석한 항 AFB_1 항체 100 μl를 microtiter plate의 well에 채우고 4℃ 하룻밤 또는 37℃, 3시간 방치하여 coating시킨 후, wash buffer(0.02 M tris, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.4) 180 μl로 3회 세척하였다. 그 다음 wash buffer에 1/50으로 희석한 AFB_1-HRP와 시료용액(70% MeOH에 용해된 AFB_1 용액)의 1 : 1 혼합액을 100 μl씩 well에 넣고 상온에서 1시간 방치하여 경합적인 항체·항원반응을 시켰다. Wash buffer로 5회 세척한 후 기질용액(0.1% ABTS, 0.1 M citric acid-phosphate buffer, pH 4.0, H_2O_2를 사용직전에 0.02% 첨가) 100 μl를 첨가하여 상온에서 20분간 방치하여 녹색으로 발색시킨 다음, 반응정지액(0.1% NaN_3) 100 μl를 첨가하였다. Microplate reader로 파장 405 nm(대조파장 492 nm)에서 각 well의 흡광도(A_{405})를 측정하였다. 동일 시료에 대하여 각각 3개씩의 well을 사용하여 얻어진 흡광도의 평균값으로 분석하였다.

ELISA를 위한 시료의 처리

곡물시료 중에 함유된 AFB_1을 추출하기 위하여 분쇄곡물 10g에 추출용매인 70% MeOH 50 ml을 가하여 1시간 교반한 후 Whatman 42번 여과지를 통과시켰다. 이 여액을 독소용액으로 사용하였다. 표준곡선의 작성을 위한 독소용액은, 오염되지 않은 곡물추출액에 농도별로 첨가한 것을 사용하였다. 한편 spike test를 위하여 오염되지 않은 분쇄곡물 10g에 일정량의 표준독소(AFB_1)를 첨가하여 상온에서 하룻밤 방치한 다음, 위와 같은 방법으로 추출하고 분석에 사용하였다. AFB_1의 첨가는 1, 3, 10, 30, 100 ng/g 농도로 각각 2개씩 처리하였다.

HPLC에 의한 AFB_1의 분석

500 ml 삼각플라스크에 마쇄한 50g의 시료와 25g의 celite, 250 ml $CHCl_3$, 25 ml H_2O를 넣고 30분간 진탕기로 추출한 후 여과지(Toyo, No.2)로 여과하였다. 65 ml의 여과액을 감압농축한 후 2 ml $CHCl_3$에 녹여 6 ml *n*-hexane과 함께 Sep-Pak silica cartridge(Waters, Part No.51900)에 주입하였다. 그뒤 10 ml *n*-he-

xane으로 세척하고 150 ml의 ether-hexane(3 : 1, v/v)으로 다시 세척한 후, 150 ml $CHCl_3$-MeOH(97 : 3)로 용출시켰다. 용출액은 감압농축 후 3 ml $CHCl_3$로 녹이고 이중 1.26 ml을 vial로 옮겼다. 이를 질소가스를 이용하여 건조시켜 분석시까지 냉동보관하였다. HPLC 분석시 건조된 추출물에 100 μl TFA를 넣고 1분간 vortex로 교반 후 900 μl acetonitrile-H_2O(1 : 1)를 다시 혼합하였다. 1 ml의 시료는 membrane filter(Whatman, polypropylene backed, 0.5 μm)를 이용하여 여과 후 분석하였다. 분석시 column은 Zorbox-ODS(Φ4.6×150 mm, C_{18})을, 용출용매로는 acetonitrile-H_2O(3 : 7)를 1 ml/min의 유속으로, 검출은 형광검출기(Shimadzu, RF-535)를 이용하여 여기파장 345 nm, 방출파장 440 nm로 행하였다.

결 과

표준곡선의 작성

곡물 중 AFB_1 등의 독소를 ELISA로 분석할 때 염두에 두어야 할 점은 유기용매로 독소를 추출시 곡물유래의 방해물질이 추출액 중에 함께 존재한다는 것이다(14). 따라서 독소추출액을 다시 희석하여 ELISA에 사용하기도 하나 감도가 떨어지므로(4, 8, 10), 추출용매(70% MeOH) 중의 AFB_1 농도에 따라 작성한 표준곡선을 보정하였다. 즉, HPLC의 결과로부터 AFB_1이 오염되지 않은 것으로 나타난 곡물시료의 추출액에 AFB_1 표준품을 농도별로 첨가하고 ELISA를 행하여 표준곡선을 작성하므로써, 이를 인위적 및 자연적으로 오염된 시료 중의 AFB_1 농도를 측정하는 기준으로 삼았다(단, 면실박의 경우는 trace 오염된 것을 기준으로 사용). 이때 면실박, 채종박, 대두박, 옥수수 등 각 곡물별로 작성한 표준곡선(Fig. 1)은 추출용매에 표준독소를 첨가한 경우(15)에 비하여 전체적으로 발색도가 다소 낮아졌으나 그 유형은 비슷하였다. AFB_1의 검출범위는 대체로 0.2~20 ng/ml였으나 독소의 추출시 그 농도가 5배로 희석되므로 실제 곡물시료 중의 검출농도 범위는 1~100 ng/g임을 알 수 있다.

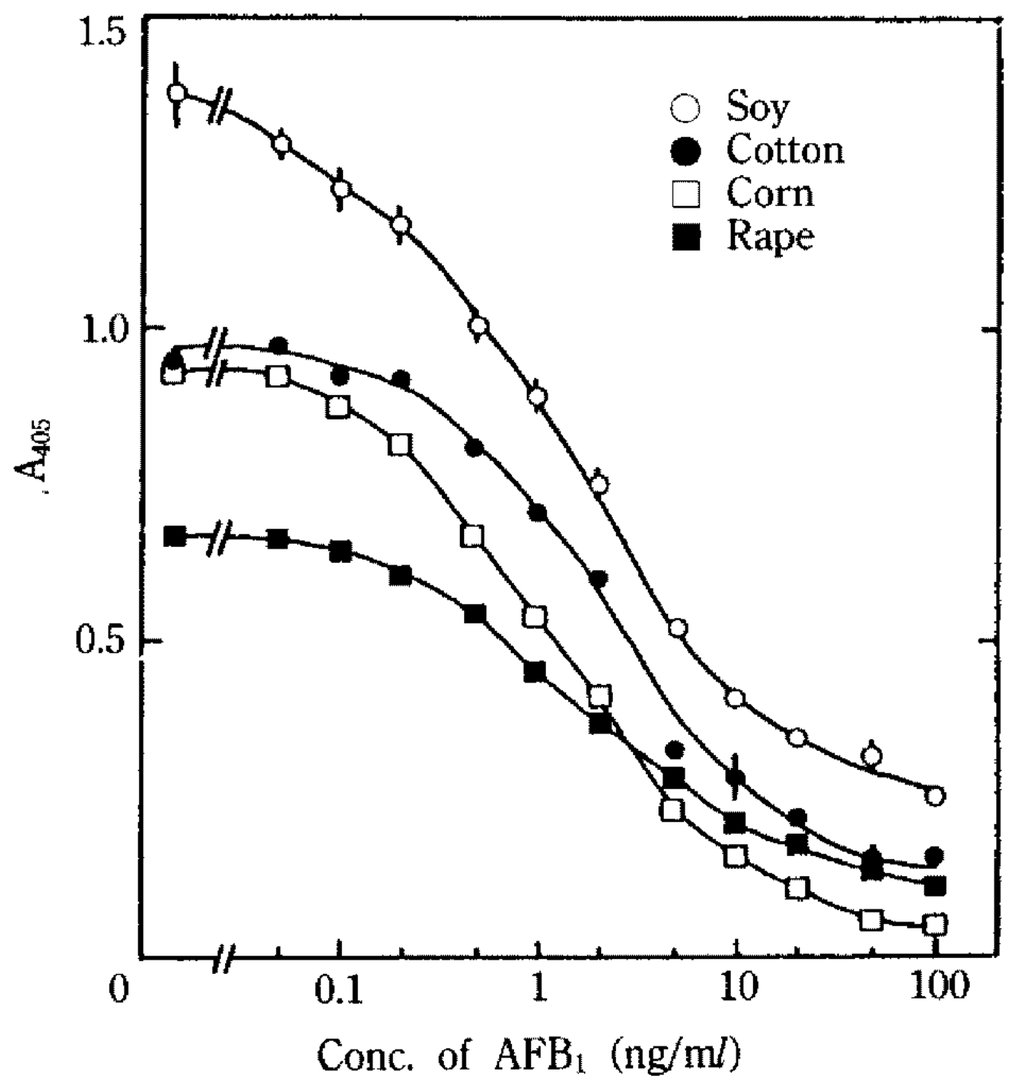

Fig. 1. Standard curves by direct competitive ELISA for AFB_1 in soybean meal, cotton seed meal, corn, and rape seed meal.
Each point and bar represents an average and standard deviation of 3 determinations.

Table 1. Recovery of AFB_1 from artificially contaminated samples as determined by direct competitive ELISA

Added (ng/g)	Detected (ng/g)*				Recovery (%)				
	Cotton seed meal	Rape seed meal	Soybean meal	Corn	Cotton seed meal	Rape seed meal	Soybean meal	Corn	Average
1	3.3± 0.4(12.1)	1.8± 0.4(22.2)	2.3± 0.3(13.0)	3.3± 0.1(1.5)	330	180	230	330	268
3	4.6± 0.1 (2.1)	3.3± 0.0 (0.0)	5.0± 0.7(11.4)	5.8± 1.0(17.2)	153	110	167	193	156
10	11.2± 0.4 (3.6)	9.9± 1.1(11.1)	17.3± 0.4 (2.3)	15.7± 0.2 (1.0)	112	99	173	157	135
30	24.1± 2.3 (9.5)	32.0± 2.6 (8.1)	34.8± 0.5 (1.4)	44.0± 6.1(13.8)	80	107	116	147	112
100	67.9± 0.0 (0.0)	144± 0.0 (0.0)	153± 8.8 (5.8)	184± 2.1 (2.5)	68	144	153	184	137
Mean Recovery, %					149	128	168	202	162
Mean C.V., %					5.5	8.3	7.0	7.2	7.0

*Mean± SD(CV, %) of 2 replicates in 3 wells on a microtiter plate.

인위적으로 오염시킨 시료의 분석

면실박, 채종박, 대두박, 옥수수 등 각 곡물의 기준시료 분쇄물에 1~100 ng/g 농도의 AFB_1을 오염(spike)시킨 후, 70% MeOH로 독소를 추출하여 ELISA를 행하였다. 위의 표준곡선을 기준으로 하여 spike한 각 시료의 최종흡광도로 오염도를 분석한 결과는 Table 1과 같다. 대체로 분석치는 spike치 보다 약간 높아서 평균 162%(68~330%)로 나타났다. 특히 1 ng/g의 저농도로 오염시킨 경우 그 수치는 높게 나타나 평균 268%의 분석치를 보였다. 이는 저농도로 오염된 시료에서는, 농도차에 따른 발색치의 차이가 그다지 크지 않았기 때문에 오차가 크게 나타날 수 있었던 것으로 생각된다. 그러나 이보다 높은 농도에서는 대체로 양호한 수치를 보였다. 곡물시료의 종류별로는 채종박의 경우 분석치가 spike치에 대하여 평균 128%(99~180%)로 가장 양호하였으나, 옥수수의 경우 202%(157~330%)로 2배가량 높은 수치를 나타내었다. 각 분석치의 상대적인 분산정도(변이계수 : C.V.)는 평균 7.0%(0~22.2%)로 매우 양호하였다.

Table 2. Comparison of results of ELISA and HPLC quantitation of AFB_1 from naturally contaminated samples

Cereal	Sample No. & country[2]	AFB_1 (ng/g) ELISA	AFB_1 (ng/g) HPLC	Recovery (E/H)[1] %	Sample No. & country	AFB_1 (ng/g) ELISA	AFB_1 (ng/g) HPLC	Recovery (E/H) %
Cotton	6 C	16.6	18.5	90	66 C	151	81.9	184
seed	14 A[3]	7.1	0.0	–	95 C	39.7	21.1	188
meal	15 C	42.6	57.7	74	107 C	26.3	20.4	129
(78 C)[4]	27 C	28.1	26.8	105	108 C	22.4	20.6	109
	32 C	53.6	52.8	102	111 C	19.0	51.9	37
	34 C	3.8	1.1	346	120 C	22.4	11.1	202
	35 C	3.4	1.3	262	123 C	60.1	51.1	118
	36 C	104.5	11.7	(893)[5]	125 C	74.0	76.2	97
	48 C	106.9	7.7	(1388)				
	57 C	16.6	9.1	182	Av.	44.3	28.9	153[6]
Rape	38 C	0.2	3.5	6	80 I	2.6	4.3	59
seed	43 C	0.4	9.0	4	83 I	0.0	2.4	0
meal	53 I	0.0	4.7	0	94 I	0.3	1.9	16
(37 C)	56 I	0.2	2.1	10	118 I	0.0	(0.5)[7]	0
	67 C	0.2	10.1	2				
	72 I	17.2	2.1	(814)	Av.	2.1	4.1	59
Soybean	5 I	1.7	3.7	47	65 C	1.9	(0.5)	380
meal	28 I	3.2	6.5	49	77 I	2.6	5.1	52
(44 C)	39 I	2.6	1.6	165	110 C	1.7	4.1	41
	47 C	1.4	0.0	–				
	47 C	1.4	0.0	–				
	55 I	1.9	1.1	173	Av.	2.1	2.8	75
Corn	29 C	13.5	26.8	50				
(21 C)	30 C	0.0	8.9	0	Av.	6.8	17.9	38

[1](AFB_1 conc. by ELISA/AFB_1 conc. by HPLC)×100.
[2]Country: C=China, A=Australia, I=India.
[3]Sample 14A was cotton seed, which was not defatted.
[4]Standard sample No. and country for the standard curve of ELISA.
[5]Extraordinarily large amount of recovery.
[6](Average AFB_1 by ELISA/average AFB_1 by HPLC)×100.
[7]Trace by HPLC was assumed as 0.5 ng/g.

자연적으로 오염된 시료의 분석

한편 ELISA 및 HPLC에 의한 AFB_1 분석치를 서로 비교하기 위하여 자연적으로 오염된 40여 시료를 분석한 각각의 수치를 Table 2에 나타내었다. 전체적으로 보면 10 ng/g 이하로 오염된 시료에 대한 두 분석치 간에는 차이가 다소 크게 나타났으나, 그 이상의 농도로 오염된 시료에서는 몇몇 예외(36번, 48번, 72번 등)를 제외하고는 비교적 근사한 수치로 나타냈다. 곡물의 종류별로 보면 가장 높은 오염도를 나타낸 면실박의 경우, 몇몇 시료(14번, 36번, 48번)를 제외하면 두 분석치의 비율(E/H)이 약간 높기는 하나 매우 양호한 결과를 보였다. HPLC에 의한 분석으로 오염도가 10 ng/g 이하로 낮게 나타난 시료 중, 대두박의 경우 E/H의 비율이 평균 75%로 약간 낮은 반면, 채종박의 경우는 72번 시료를 제외하면 그 비율이 평균 11%로 상당히 낮게 나타났다(Table 2).

이상과 같이 자연오염된 시료의 경우, 곡물의 종류별로 시료의 수가 그다지 많지 않은 문제가 있고 곡물의 종류별로 ELISA 분석치가 다소 차이를 나타내었으나, 10 ng/g(ppb) 이상의 농도에서 대체로 양호한 결과를 보였다. 그러므로, 본 효소면역측정법에 의한 수입곡물 중의 AFB_1 분석은 오염도가 10 ppb 이상인 시료에 활용할 수 있는 것으로 나타났다. 이는 국내에서 aflatoxin의 오염허용치가 B_1을 기준으로 하였을 때, 식품에서 10 ppb, 배합사료에서 20 ppb, 원료사료에서 50 ppb 이하인 점(1, 2)을 감안하면 충분히 실용화가 가능하다고 생각된다.

고 찰

면실박 시료의 분석결과를 중심으로 본 연구에서의 분석방법을 다른 방법과 비교하기 위하여, 근년 미국에서 인정받고 있는 상업적인 aflatoxin 검출법을 알아보면 대체로 다음과 같다. 즉, ELISA를 이용한 분석방법(상품명 : Afla-20-Cup, Agri-Screen, EZ-Screen)이나 immuno-affinity column을 이용한 분석방법(상품명 : Aflatest, OXOID, SAM-A, HV-minicolumn)을 채택하고 있는 이들 상업적인 방법은 인위적으로 10 ppb 이상의 독소를 옥수수에 오염시킨 시료의 분석시 그 회수율이 평균 200% 가량이었다(9). 또한, 자연오염된 20개 가량의 옥수수시료 분석시도 그 회수율은 높게 나타났으며 Agri-Screen을 제외하고는 모두 통계적으로 유사한 결과를 나타내었고, 이 Agri-Screen도 TLC에 의한 결과와는 통계적으로 유사한 결과를 나타내고 있었다. 그리고 어느 방법에 의하여든지 몇 점의 시료에 대한 분석치는 오염치와 비교시 현저한 차이를 나타낸 것이 있었다(9). 따라서, 본 연구에서의 분석방법은 앞에서 열거한 상업적인 방법에 비교될 수 있는 양호한 aflatoxin의 분석방법임을 알 수 있다.

한편, 본 분석법에 사용된 항AFB_1 항체가 유사독소인 B_2, G_1, G_2와 교차반응이 일어날 수 있다. 그러나 전보(15)에서 검토된 바에 의하면 그 교차반응이 3~34%로 비교적 낮았으며, HPLC 분석결과 유사독소가 포함되어 있었던 시료는 중국산 면실박 뿐이었고 그 비율도 전체 aflatoxin 농도의 약 25% 정도에 불과하였다. 따라서, 본 연구에서 교차반응에 의한 분석상의 문제는 미약하다고 생각한다.

곡물시료 중의 독소를 ELISA로 분석할 때 기준곡물의 선택이 매우 중요함을 본 연구에서 알 수 있었다. 예를들면, HPLC에 의한 분석결과 중국산 면실박 시료는 모두 AFB_1이 오염된 것으로 나타났으므로 AFB_1이 전혀 검출되지 않았던 호주산 미탈지 면실시료(14번)를 기준곡물로 하였을 때, 중국산 면실박시료 78번, 35번, 34번의 최종흡광도는 각각 1.156, 1.108, 1,057로 표준곡선상의 최고 흡광도인 0.938을 초과하여 이들 시료중의 AFB_1 농도 측정이 불가능하였다. 그래서 위 세 시료중 최고의 흡광도를 나타낸 중국산 시료 78번(HPLC 분석치, trace)를 기준으로 표준곡선을 작성하고 분석하였을 때, 35번, 34번, 14번 시료의 ELISA 분석치는 각각 3.4, 3.8, 7.1 ppb(HPLC 분석치는 각각 1.3, 1.1, O ppb)으로 나타났다(Table 2). 이때 여타의 면실박 시료에는 대체로 높은 농도의 AFB_1이 오염되어 있어 기준곡물에 극미량 오염되어 있는 AFB_1의 영향은 무시할 수 있었다. 그러나, 호주산 시료(14번)의 ELISA 분석치는 HPLC 분석치에 비하여 심한 차이를 보였다. 이와 같이 기준곡물의 탈지유무 그 분석치에 영향을 줄 수 있음을 알게 되었다.

그 이외에 품종이나 재배산지 또는 수확시기에 의해서도 영향을 받음이 보고되고 있으므로(16), 이러한 문제를 감안하여 특정곡물의 기준시료를 선택할 때는 신중을 기할 필요가 있다. 또한, HPLC에 의하여 독소가 오염되지 않은 것임이 밝혀진 시료들이라도 이를 곧바로 기준곡물로 사용하기 보다는, 그 추출액들에 대한 예비적인 ELISA를 행하여 흡광도가 가장 높게 나타나는 시료를 기준곡물로 선택하여 사용함이 바람직하다고 생각된다.

기타의 문제점으로는 몇몇 시료의 경우 HPLC 분석치와 ELISA 분석치가 심한 차이를 나타냄을 들 수 있는데, 이는 시료의 준비시 일정량의 곡물을 분쇄한 후 혼합하는 과정에서 시료의 불완전한 처리에 기인하는 바가 가장 큰 요인으로 생각된다.

이상의 문제점에 유의하여 본 효소면역측정법으로 AFB_1을 분석하면 신속·간편하며 검출감도가 매우 높고 경제적이어서, 특히 한꺼번에 많은 시료를 일차적으로 screening할 때에 매우 효과적인 것으로 나타났다. 또한 이 분석법은 시료의 처리방법을 개량하거나 검출감도를 개선하면, 곡물이외에 사료, 축산물, 식품, 인체에 이르기까지 각 단계별로 AFB_1의 존재를 감시하는 수단으로도 활용가능하리라 생각한다.

요 약

곡물 중의 aflatoxin B_1(AFB_1)을 검출하는 방법으로서 효소면역측정법(ELISA)의 활용가능성을 평가하기 위하여, ELISA 분석치를 인위적인 오염치 및 자연오염된 시료의 HPLC 분석치와 비교하였다. 분석대상 시료로는 외국산 면실박(19점), 채종박(11점), 대두박(9점), 옥수수(3점) 등의 수입곡물을 사용하였다. 각 곡물별로 작성한 표준곡선으로부터 실제 곡물시료 중 대체로 1~100 ng/g 농도의 AFB_1이 분석가능함을 알 수 있었다. 이를 기준으로 하여 표준 AFB_1을 인위적으로 오염시킨 시료를 ELISA로 분석하였을 때, 1 ng/g의 저농도에서는 그 회수율이 높았으나(평균 268%) 3 ng/g 이상의 농도에서는 평균 138%(68~193%)이었으며, 각 분석치의 상대적인 분산도(C.V.)는 평균 7.0%(0~22%)로 매우 양호하였다. 한편 자연오염된 시료의 ELISA 분석치를 HPLC 분석치와 비교하였을 때, 10 ng/g 이하의 시료에서는 특히 채종박의 경우 두 분석치 간에 차이가 다소 크게 나타났으나, 그 이상의 오염시료에서는 몇몇 예외를 제외하고는 비교적 근사한 수치를 나타내었다. 특히 오염도가 심각한 면실박의 경우 HPLC 분석치에 대한 ELISA 분석치의 비율이 평균 153%로 양호하였다. 따라서 본 효소면역측정법은 10 ng/g 이상의 AFB_1이 오염된 곡물시료의 분석에 실용화가 가능한 것으로 나타났다.

감사의 말

본 연구는 1990년 과학기술처의 UR대응 농업개발 기술과제로 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. 법제처(편). 1991. 사료관리법시행령. p.259. 대한민국현행법령집, 제 28권, 한국법제연구소, 서울.
2. 한국식품연구소(편). 1991. 일반식품성분 규격 및 기준. p.18. 식품첨가물 사용기준 편람, 보건사회부, 서울.
3. Busby, W.F., Jr. and G.N. Wogan. 1979. Food-borne mycotoxins and alimentary mycotoxicoses. pp.519-610. *In* Riemann, H. and F.L. Bryan(eds.), *Food-bore Infections and Intoxification*, 2nd ed., Academic Press, New York.
4. Chu, F.S., T.S.L. Fan, G.S. Zhang, Y.C. Xu, S. Faust, and P.L. McMahon. 1987. Improved enzyme-linked immunosorbent assay for aflatoxin B_1 agricultural commodities. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **70**: 854-857.
5. Chu, F.S., M.T.S. Hsia, and P.S. Sun. 1977. Preparation and characterization of aflatoxin B_1-1-(*o*-carboxymethyl)oxime. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **60**: 791-794.
6. Chu, F.S. and I. Ueno. 1977. Production of antibody against aflatoxin B_1. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**: 1125-1128.
7. Cooper, H.M. and Y. Paterson. 1991. Production of antibodies. pp.2.4.1.-2.4.7. *In* Coligan, J.E., A.M. Kruisbeek, D.H. Margulies, E.M. Shevach, and W. Strober(eds), *Current Protocols in Immunology*, Vol.1, John Wiley & Sons, New York.
8. Fan, T.L.S., G.S. Zhang, F.S. Chu. 1984. An indirect enzyme-linked immunosorbent assay for T-2 toxin in biological fluids. *J. Food Prot.* **47**: 964-967.
9. Koeltzow, D.E. and S.N. Tanner. 1990. Comparative evaluation of commercially available aflatoxin test methods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **73**: 584-589.
10. Liu, M.T., B.P. Ram, L.P. Hart, and J.J. Pestka. 1985. Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the mycotoxin zearalenone. *Appl. Environ. Mirobiol.* **50**: 332-336.
11. Park, D.L. and A.E. Pohland. 1986. Foodborne microorganisms and their toxins, pp.425-438. *In* Pierson, M.D. and N.J. Stern(eds.), *Developing Methodology*, Marcel Dekker, N.Y.
12. Pathre, S.V. and C.J. Mirocha. 1976. Assay methods fortrichotecenes and review of their natural occurrence, pp.229-253. *In* J.V. Rodricks et al

(ed.), *Mycotoxins in Human and Animal Health.* Pathotox, Park Forest South, IL.
13. Pestka, J.J. 1988. Enhanced surveillance of food-borne mycotoxins by immunochemical assay. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **71**: 1075-1081.
14. Ram, B., L.P. Hart, R.J. Cole, and J.J. Pestka. 1986. Application of ELISA to retail survey of aflatoxin B_1 in peanut butter. *J. Food Prot.* **49**: 792-795.
15. Shon, D.H., A.R. Park, B.C. Seo, J.C. Kim, Y.W. Lee, Y.J. Nam, and S.W.D. Hawer. 1992. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Aflatoxin B_1. *Kor. J. Appl. Microbiol. and Biotechnol.* **20**: 225-232.
16. Wratten, S.J. and P.C.C. Feng. 1990. Pestcide analysis by immunoassay, pp.201-220. *In* J.H. Rittenburg(ed.), *Development and Application of Immunoassay for Food Analysis.* Elsevier Appl. Sci., London.
17. WHO Expert committee on Biological saturation. 1981. Requirements for immunoassay kits. *World Health Organization technical report,* series No.658, WHO, Geneva.

(Received March 27, 1992)