

Enzyme Linked Immunosorbent Assay를 利用한 眞菌毒素 檢出에 관한 研究

廉 鎰·劉 承 兆*·李 長 勳**

단국대학교 미생물학과, *성균관대학교 약학과, **호서대학교 환경공학과

Studies on the Mycotoxin Detection by an Enzyme Linked Immunosorbent Assay

K. Ryeom, S.J. Yu*, J.H. Lee**

Dept. of Micro. Dan Kook University, *Dept. of Pharm. Sung Kyun Kwan University,

**Dept. of Environ. Engin., Hoseo University

ABSTRACT

Aflatoxins, produced by strains of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*, can be found worldwide in corn, barley, peanuts, and other commodities.

Among this group of toxins, aflatoxin B₁ was realized to be one of the most potent environmental carcinogens, mutagens and teratogens.

It is routinely monitored by methods such as thin layer chromatography, liquid chromatography, fluorodensitometric technique and radioimmunoassay.

However, these assays are expensive, necessitate radioactive reagents, and require overnight incubation.

In this study, the determination of fungal flora in several sorts cereals has been carried out in order to obtain an appropriate information of the population of fungi.

The quantitative analysis of aflatoxin B₁ has been carried out by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method and Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).

The results were summarized as follow:

1) From the 100 samples, 313 colonies of fungi were isolated. Among the 313 colonies, 274 were possible to identify into 11 genera. The identified genera were *Aspergillus*,

Penicillium, Mucor, Rhizopus, Alternaria, Cladosporium, Fusarium, Circinella, Chrysosporium, Paecilomyces and *Phoma*.

2) Six of *Aspergillus flavus* were aflatoxin-producing strains.

Aspergillus flavus isolated from sample barleys was contained the highest content (21.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$) of aflatoxin B₁.

3) The yield of aflatoxin B₁ — oxime compound was appromately 75%. Aflatoxin B₁ — oxime — Human serum albumin was approved by formal consent as complete antigen.

4) Direct competitive ELISA permitted detection of 0.15 ng levels.

In the quantitative microanalysis, ELISA was superior to HPLC method.

서 론

1950년대에 곰팡이 오염 독작용에 대한 임상적 소견이 여러가지 형태로 나타나 심각한 문제로 인식되었지만¹⁾ 그 당시에는 활발한 연구가 이루어지지 않았으며 가축에서 야기되는 질병중에 진균의 2차 대사 산물인 진균독에 의해 발병될 수 있다는 추측이 가능했으나 과학적으로 입증되지는 못하였다^{2,3)}. 그러나 이러한 진균독의 원인 물질이 *Genus aspergillus*에서부터 야기되는 2차 대사 산물로 aflatoxin이라는 물질로 밝혀지게 되었다⁴⁾.

그후 aflatoxin에 대한 연구는 주위환경 및 생체 내로부터 단시간내에定性 定量的으로 검출하여 그對策을 강구하고자 연구가 활발히 진행되었으며, aflatoxin 精製 기술도 크게 發展되어 가고 있다.

초기 研究過程에서는 극성용매를 사용하여 추출한 crude aflatoxin의 精製를 위하여 silicic acid, silicagel, acid alumina, sephadex G-10, adsorbosil-1, adsorbosil-5 등을 이용하는 column chromatography가 채택되었다^{5,6)}.

그후 Thin Layer Chromatography(이하 TLC로 약칭함)를 이용하여 精製한 aflatoxin이 特徴적인 형광 斑點을 觀察하므로써 광범위한 screening을 할 수 있게 되었으며 TLC densitometer^{7,8)}를 사용하여 定量이 可能해졌으나 특이도와 감도가 High Performance Liquid Chromatography(이하 HPLC로 약칭함)법 보다 떨어지기에 많은 HPLC

법이 aflatoxin의 定量法으로 널리 이용되어졌다^{9,10)}.

또한 laser 광선을 이용한 定量法도 개발이 되었으나 장치의 複雜性和 設備의 고가로 인하여 광범위하게 應用하기에는 곤란하였다¹¹⁾.

이와같이 器機分析에 의한 方法의 發達 등으로 化學的 測定方法은 눈부신 發展을 하였지만 抽出 溶媒가 고가이며 전처리 및 抽出過程이 複雜하기도 하고 자외선 등을 이용하여 定量하기에 자외선에 민감한 aflatoxin이 破壞되어 正確한 定量에 어려움이 따랐고, 生物學的 測定方法은 널리 開發되지 않은 현시점을 감안하여 著者は 서울시내 25개 穀類商으로부터 무작위로 試料 100건을 蒐集하여 眞菌의 分離率과 分布를 微生物學的으로 確認하였으며 이들 分離 菌株로부터 aflatoxin B₁을 生産케 하였으며 分子量이 312인 저분자 化合物로 抗原성이 없는 aflatoxin B₁에 O-carboxymethylamine·HCl을 反應시켜 oxime radical을 도입시킨 다음 Human Serum Albumin(이하 HSA라 약칭함)으로 aflatoxin B₁-oxime-HSA 化合物을 만들어 完全抗原으로 製造하였다.

製造된 抗原을 사용하여 抗原으로서의 역할을 確認하였으며, 生成된 抗毒素로서 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(이하 ELISA라 약칭함)를 利用하여 aflatoxin B₁ 검출을 시행하고 얻어진 結果를 化學的 檢출법과 비교 分析하여 的의있는 結論을 얻었기에 이에 報告하는 바이다.

實驗材料 및 方法

1. 實驗材料

① 試料 : 서울시내 25개 穀類商으로부터 무작위로 쌀, 보리, 옥수수, 땅콩, 밀 50 g씩을 수집하여 試料로 使用하였다.

② 對照菌株 : *Aspergillus flavus* ATCC 15517
Aspergillus parasiticus NRRL 2999
Aspergillus fumigatus ATCC 10894
Aspergillus niger ATCC 32656

③ 培地 : sabouraud dextrose agar (Difco)
sabouraud dextrose broth (Difco)

④ 試藥 : Sigma chemical Co.의 특급시약을 使用하였다.

2. 實驗方法

① 眞菌의 分離培養 및 同定

試料 1 g씩을 1% HCl 溶液에 1분간씩 수침시킨 후 멸균 증류수로 세척한 후 sabouraud dextrose broth 배지에 接種하였다.

30±1°C로 10일간 培養하면서 생성된 形態學의 特性중 육안적으로 차이나는 것을 1차적으로 分離하고 각각을 sabouraud dextrose agar 평판 培地에 3회 연속 계대 培養하였다.

또한 슬라이드 培養法¹²⁾으로 培養한 후 현미경 觀察에 의해 hyphae의 넓이와 形態, 構造, conidia의 유무, 形態, 크기, 數, hyphae에 연결된 狀態 등을 確認하여 眞菌屬을 分類하였다.

② aflatoxin 生成株의 孢子懸濁液 製造

分離同定된 眞菌株중 aflatoxin 生成可能性이 가장 높은 *Aspergillus flavus* 菌株의 孢자를 단계별로 멸균 증류수를 가하여 희석하고 현미경으로 觀察하여 孢子數가 10⁵/ml이 되도록 조정한 후 보관하여 必要時 使用하였다.

③ 眞菌의 純粹培養 및 眞菌 粗毒素의 抽出

孢子懸탁액 0.5 ml를 sabouraud dextrose

broth 培地 100 ml에 接種후 30±1°C에서 10일간 진탕 培養하였다.

既存方法에 의해¹³⁾ 진균조독소를 추출하여 잔액이 20 ml될 때까지 rotary evaporator에서 감압 농축시켜 냉장고에 차광 밀봉하여 보관한 후 必要時 使用하였다.

④ 粗毒素의 分離 精製 및 確認

抽出보관해 두었던 粗毒素 20 ml를 가하여 column에 흡착시킨 후 질소 gas를 이용하여 流速 4 ml/min.로 조절하였으며 n-hexane 150 ml, ether 150 ml, chloroform : methanol (97 : 3) 200 ml의 순서로 流出시키면서 1분 간격으로 分離된 流出液을 증발 농축시켰다.

농축물을 전개용매 chloroform : acetone : n-hexane (80 : 15 : 20)으로 TLC에 전개시켜 aflatoxin B₁ 標準毒素와의 異同을 UV-lamp로 確認하였다. aflatoxin B₁의 生成 分離됨을 確認하기 위하여 UV spectrum, IR spectrum, NMR spectrum으로 測定하여 확인하였다. aflatoxin B₁의 定量은 HPLC에 의해 測定하였다.

⑤ aflatoxin B₁-oxime의 製造 및 確認

aflatoxin B₁-oxime의 製造는 Dean¹⁴⁾ 등에 의해 開發되어진 方法을 개량하여 제조하였으며 column을 통과시켜 분획별로 취한 流出液의 농축물을 benzene : acetonitrile (98 : 2) 0.5 ml에 녹인 후 1차 전개용매 chloroform : acetone (9 : 1)로 전개시키고 2차 전개용매 acetic acid : benzene (1 : 9)로 TLC에 전개시켜 aflatoxin 生成 分離 確認했을 때와 동일한 조건으로 UV spectrum, IR spectrum, NMR spectrum을 이용하여 새로운 物質을 確認하였다.

⑥ aflatoxin B₁-oxime-protein compound의 製造

aflatoxin B₁-oxime-protein compound의 製造는 Langone¹⁵⁾ 등의 方法을 개량하여 제조하였으며 단백질에 aflatoxin B₁-oxime이 결합된 量에 대한 確認은 362 nm에서 20950의 molar absorptivity를 이용한 spectrophotometric method에 의해 결정하였고, 단백질에 反應된 aflatoxin B₁-oxime과 미

반응물질의 양을 최종적으로 산출하여 계산하였다.

⑦ 毒素免疫

normal saline에 aflatoxin B₁-oxime-HSA의 단백질 양이 500 µg 포함되도록 만든 溶液 1 vol.에 complete freund adjuvant 3 vol.의 比率로 懸濁시킨 懸濁液을 만들어 New zealand white rabbit (*Oryctolagus cuniculus*)의 등에 털을 제거한 후 7日 간격으로 2 ml씩을 20~40군데에 나누어 소량씩 皮內注射를 하였다.

免疫 7日 후부터 귀정맥에서 채혈을 하였으며 면역가토혈청으로부터 immunoglobulin G fraction을 ammonium sulfate 침강법¹⁶⁾을 이용하여 정제 후 냉동고에 보관 必要時 使用하였다.

⑧ ELISA用 毒素의 製造

試驗用 培養菌株를 sabouraud dextrose broth 50 ml에 30±1°C로 10日間 methanol-water-N, N-dimethyl formamide(70 : 29 : 1) 溶液 25 ml로 抽出을 한 후 Whatmann No. 1 여과지로 여과하여 ELISA用 毒素로 이용하였다.

⑨ 抗毒素價의 測定

냉동건조시켜 보관한 aflatoxin B₁-oxime-polylysine을 利用하여 실험하여 反應종말액으로 2M sulphuric acid 0.1 ml씩 가하고, Dynatech minireader로 490 nm에서 absorbance를 測定하여 동일 희석 比率에서 免疫前 血清의 absorbance보다 0.1 unit가 높은 抗毒素의 희석비율을 抗毒素價로 결정하였다¹⁷⁾.

⑩ Direct competitive ELISA

Pestka¹⁸⁾ 등에 의해 고안되어진 方法을 개량하여 HSA를 Dynatech plate의 각 well에 前處理하고 하루밤을 정치시켰다.

aflatoxin B₁ 抗毒素를 1 : 500으로 희석을 하였으며 각 well에 0.32 ml씩을 가하여 37°C 40분간 反應시켰다.

각 well에 PBS-HSA 0.32 ml를 가하고, 37°C 30분간 反應시킨 후 PBS-tween으로 3회 세척을 하였으며, 1% N,N-dimethyl formamide가 함유되어 있는 PBS-HSA으로 200배 희석한 goat antirabbit IgG peroxidase conjugate와 혼합시켜 37°C에

서 1時間동안 反應시켰다.

0.1 mg/ml의 농도가 되도록 methanol로 희석한 aflatoxin B₁ 표준독소나 ELISA用 毒素抽出液을 단계별로 50 µl씩 가하여 37°C에서 1時間동안 反應시켰다. PBS-tween으로 3회 세척을 實施하고 substrate buffer를 100 µl씩 가하였다.

37°C 10분간 反應을 시킨 후 反應 종말액으로 2M sulphuric acid 0.1 ml씩을 가하고 490 nm에서 absorbance를 測定하였다.

實驗 結果

1. 穀類中의 真菌의 分布 및 分離真菌株

市販되는 쌀, 보리, 밀, 옥수수, 땅콩 등의 穀類 총 100건 中에서 真菌이 分離된 檢체는 83건으로 分離率은 83%였다.

분리된 真菌의 총 수는 313株였으며 그중 *Aspergillus* 속, *Penicillium* 속이 각각 97株, 69株로 가장 많았고, 냉대지방에서 생존가능한 *Fusarium* 속도 2株 分離되었으며, 최우선 菌株인 *Penicillium* 속이 밀에서는 분리되지 않았고, aflatoxin 生成可能 穀類로 잘 알려진 땅콩에서는 전혀 분리되지 않을 것으로 기대했던 *Chrysosporium* 속과 *Phoma* 속이 분리된 사실이 특이하였으

Table 1. Distribution of Fungi Contaminated in Cereals.

	Rice	Barley	Peanut	Wheat	Corn	Total
<i>Aspergillus</i>	22	32	19	14	10	97
<i>Penicillium</i>	19	26	15		9	69
<i>Mucor</i>	11	13	17	4	33	48
<i>Rhizopus</i>	6	4	9	6	2	27
<i>Alternaria</i>	4	7		6		17
<i>Cladosporium</i>	4	3		2		9
<i>Fusarium</i>			1		1	2
<i>Circinella</i>			2			2
<i>Chrysosporium</i>			1			1
<i>Paecilomyces</i>		1				1
<i>Phoma</i>			1			1
Other fungi	7	13	6	5	8	39
Total	73	99	71	37	33	313

며 眞菌屬을 결정하지 못한 眞菌株도 39株나 되었다 (Table 1).

또한 분리된 眞菌中 aflatoxin 生成能이 가장 높다고 알려진 *Aspergillus* 속을 분류한 결과 *Aspergillus flavus*가 28株로 최우선 菌株였으며 *Aspergillus niger*가 14株, *Aspergillus parasiticus*가 10株 分離되었고, *Aspergillus candidus*도 1株가 分離되었다(Table 2).

Table 2. Numbers of *Aspergillus* sp. Isolated from Cereals.

	Rice	Barley	Peanut	Wheat	Corn	Total
<i>A. flavus</i>	7	9	4	5	3	28
<i>A. niger</i>	2	5	4	1	2	14
<i>A. parasiticus</i>	3	4	1	1	1	10
<i>A. oryzae</i>	4	2	1	1	1	9
<i>A. versicolor</i>	1	1	1	3	1	7
<i>A. clavatus</i>		3	1		1	5
<i>A. restrictus</i>		1	1	1	1	4
<i>A. fumigatus</i>	1	2		1		4
<i>A. wentii</i>			3			3
<i>A. ornatus</i>	1	1	1			3
<i>A. ochraceus</i>	2	1				3
<i>A. nidulans</i>		2				2
<i>A. glaucous</i>	1		1			2
<i>A. terreus</i>		1		1		2
<i>A. candidus</i>			1			1
Total	22	32	19	14	10	97

2. 粗毒素의 生成能 確認 및 定量

분리된 眞菌株 中 aflatoxin 生成能이 가장 높다고 알려진 *Aspergillus flavus* 菌株 28株를 sabouraud dextrose broth 培地에 培養하여 aflatoxin 生成能을 TLC로 定性 確認해 본 結果 쌀로부터 분리된 菌株中 2株, 보리로부터 분리된 菌株

Table 3. Comparison of Aflatoxin B₁ Productibility of *Aspergillus flavus* Isolated from Cereals.

Rice I	13.9
Rice II	.
Barley I	8.4
Barley II	21.8
Peanut	2.5
Corn	

中 2株, 땅콩, 옥수수로부터는 각각 1株가 형광을 나타내어 모두 6株의 aflatoxin 生成 可能株를 분리하였다.

HPLC를 이용하여 aflatoxin을 生成하는 菌株의 aflatoxin B₁의 生成能을 定量한 結果 쌀 II와 옥수수에서 분리된 菌株에서는 aflatoxin B₁이 生成되지 않았고, 보리에서 分離된 菌株에서 가장 많은 양의 aflatoxin B₁이 검출되었다(Table 3).

3. aflatoxin B₁-oxime의 確認

합성한 aflatoxin B₁-oxime을 確認하기 위하여 TLC에 전개시킨 結果 Rf value가 0.09, 0.23, 0.38이었으며 column을 통과 分離 정제한 結果 收得率은 75%이었다.

4. aflatoxin B₁-oxime-HSA의 確認

構造的으로 確認된 aflatoxin B₁-oxime과 HSA와 反應시킨 物質은 고분자량이기때 UV spectrophotometer로 確認하였으며, 362 nm에서 흡수극대가 나타남으로써 aflatoxin B₁과 기본 발색단은 변함이 없음을 알 수 있었다.

5. 抗毒素價 測定 및 ELISA에 의한 定量

indirect ELISA로 490 nm에서 absorbance를

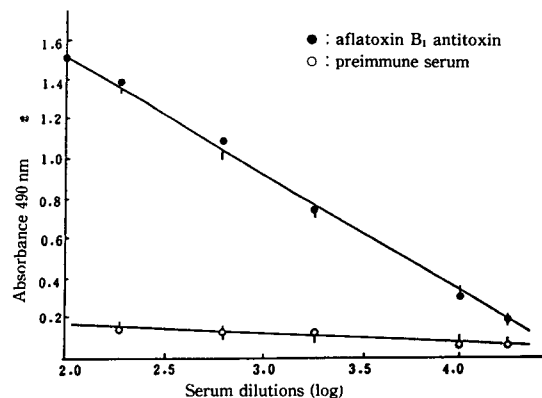


Fig. 1. Indirect ELISA Titration of Aflatoxin B₁ Antitoxin.

測定하여 抗毒素價를 測定한 結果 초회 면역 실시 후 5週째에 채혈한 抗毒素의 최고 높은 absorbance는 1:200의 희석 抗毒素에서의 absorbance가 1.5 unit가 나타남을 알 수 있었고, 1:20,000 희석 항독소에서 absorbance가 동일 희석의 免疫前 血清과의 absorbance의 차이가 0.1 unit가 되므로 抗毒素價로 결정하였으며, 희석비율이 높을수록 absorbance의 unit가 작아짐을 確認하였다(Fig. 1).

또한 抗毒素價는 면역 후 2週째부터 나타나기 시작하였으며 5週째에 가장 높은 抗毒素價가 생성되었고 6週째부터는 감소되는 현상을 確認하였다(Fig. 2).

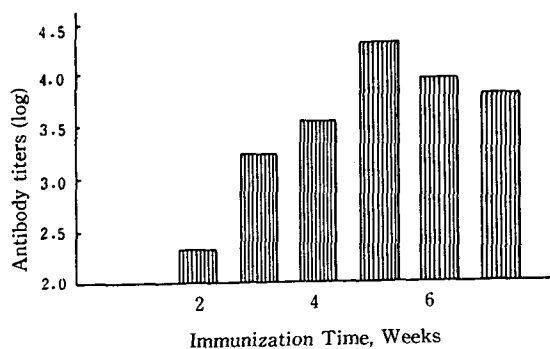


Fig. 2. Production of Antibody Against Aflatoxin B₁.

標準菌株로 ELISA와 HPLC를 이용하여 定량을 實施하여 본 結果 *Aspergillus flavus* ATCC 15517과 *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999에서는 동일한 조건의 ELISA보다 HPLC에서 더 많은 양의

Table 4. Comparison of ELISA and HPLC for Aflatoxin B₁.

	Aflatoxin B ₁ µg/ml	
	ELISA	HPLC
<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 15517	45.5±10.4	67
<i>Aspergillus parasiticus</i> NRRL 2999	18.8±3.6	21
<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 10894	14.8±3.4	12
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 32656	5.3±0.6	.

aflatoxin B₁이 定量됨을 알 수 있었고, *Aspergillus niger* ATCC 32656은 ELISA에서만 aflatoxin B₁이 미량 검출되었다.

그러므로 많은 양의 毒素가 存在할 때의 定量에서는 HPLC法이 收得率이 높았으나 미량 毒素의 定量에서는 HPLC法보다 ELISA가 우수함을 알 수 있었다(Table 4).

考 察

지구상에는 수많은 種類의 真菌이 存在한다고 알려져 왔으며, 인류생활과 밀접한 關係를 가지면서 抗生物質 生産과 食品醱酵工業 등에 이용되면서 이러한 역할을 해온 真菌株가 있는 반면에 不完全菌株로 分類되어 질병을 야기시키는 真菌株가 存在하는 것으로 알려져 있었다.

真菌이 분비하는 대사산물의 일종인 mycotoxin 특히 이중에서 aflatoxin group이 발암성 및 독성 물질로 알려진 이래 真菌에 대한 관심이 학계에 높아지게 되었으며 더우기 최근에는 대부분의 癌이 주위환경 요인에 의해 發生될 수 있다는 사실로 真菌의 發癌物質에 대한 研究가 활발하게 進行되고 있다¹⁹⁾.

이에 著者は 真菌汚染 可能性이 높은 國內市販 穀類에서의 真菌 分布度를 確認하여 본 結果, *Aspergillus* 속이 97株, *Penicillium* 속이 69株로 분리되어 分離된 총진균주 중의 53%로 우선균주임이 確認되어 1975年 高²⁰⁾ 등이 穀類 및 食品에서 분리한 菌株중 최우선균주가 *Aspergillus* 속, *Penicillium* 속이라는 사실과 일치하였으며, 시베리아 등 냉대지방에서 生存 可能性이 높은 *Fusarium* 속도 2株가 발견된 것은²¹⁾ 收入穀類에 의해 胞子が 혼입된 것이라 사료되어 國內市販 收入穀類에 대한 검역 및 관리에 주의를 기울여야 될 것으로 사료된다.

더우기 Hitokoto²²⁾ 등이 분리한 真菌株에서도 *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* 등이 우선적으로 분리되는 것은 본 實驗에서 *Aspergillus* 속중 *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Asper-*

*gillus niger*가 53.6%의 주된 眞菌株로 분리된 사실과 일치됨을 알 수 있었다.

또한 분리된 *Aspergillus flavus* 28株중 aflatoxin이라 추정되는 형광을 띠는 物質이 분리된 眞菌株는 6株로 21.4%였으며, 이는 *Aspergillus flavus*의 모든 眞菌株가 aflatoxin을 生成하지 않는다는 사실을 알 수 있었으며 특히 Turkey-X-disease의 주된 原因食品인 땅콩에서 aflatoxin 중 가장 毒性이 강한 aflatoxin B₁이 2.6 $\mu\text{g/ml}$ 만이 生成되는 반면에 보리 II에서는 21.8 $\mu\text{g/ml}$ 의 aflatoxin B₁이 生成됨을 볼 때 Buchanan⁷⁰⁾ 등이 報告한 바와 같이 aflatoxin을 生成하는 동일한 菌株라도 環境 및 條件에 따라 生成能의 차이가 있음을 알 수 있었다.

aflatoxin 生成能에 대한 研究過程을 살펴보면 Barabolak²³⁾ 등은 TLC를 이용하여 옥수수에서 生成된 aflatoxin을 screening하였고, Allen²⁴⁾ 등은 two dimensional TLC에 의해 aflatoxin을 定性하여 왔고, Beckwith⁷⁾ 등은 TLC plate 자체에서 定量하고자 하는 fluorodensitometric technique을 이용하기 시작하였다.

fluorodensitometric technique은 손쉽고 간편하기는 하나, UV light에 예민한 aflatoxin이 破壞되며 aflatoxin 抽出溶媒의 組成에 따라 aflatoxin의 抽出程度가 다르기 때문에 변수가 많이 存在하고 있음을 알 수 있었다.

Engstrom²⁵⁾ 등에 의한 HPLC 方法이 試料處理에 比較的 複雜하고 溶媒 등의 高價에 따른 經濟的인 부담이 있기는 하나 正確度에서 위에서 설명한 方法보다 예민하기 때문에 이용되어 왔으며 detector에 따라 미량의 毒素가 민감하게 測定될 수 있으나 UV detector를 이용한 定量에서는 UV에 민감한 aflatoxin의 손실 可能性이 있었다.

그러므로 Nelson²⁶⁾ 등에 의해 應用된 radioimmuno assay가 開發되어 20 pg까지 測定할 수 있어 예민도가 HPLC 보다 높은 장점이 있었으나 放射性 同位元素를 이용하기 때문에 人體에 많은 危害를 끼치고 管理에도 어려운 점이 있었다.

이에 酵素免疫을 이용한 ELISA가 aspergillosis에 의해 야기되는 生體內 독소의 證明을 위해 開發

되어 졌으며 시험관내 反應에서도 應用하기 위해 試驗的 研究가 進行중에 있다²⁷⁾.

enzyme Immuno assay를 實施하기 위해서는 일반적으로 定量하고자 하는 物質이 enzyme에 의해 破壞되거나 變化하지 않아야 하는 enzyme의 選擇이 중요하기 때문에 enzyme의 種類와의 연관성도 고려되어야 하나, aflatoxin을 定量하고자 하는데는 현재까지 peroxidase가 이용되어 왔으며 이는 aflatoxin에 影響을 미치지 않는 enzyme이기는 하나 다른 새로운 enzyme의 이용 可能性에 대해서도 계속적으로 검토되어야 할 것으로 사료된다.

ELISA는 동일한 試料라도 實驗操作과 反應時間에 따라 편차가 存在하기에 3회 이상을 實施하여 平均值를 定量에 이용하였으며 反應의 正確度를 위해 plate에 PL, glutaraldehyde, BSA, HSA 등의 단백질을 과잉항체와 결합을 시키고자 使用하였다.

이와 같은 方法으로 ELISA를 實施한 결과 aflatoxin B₁을 0.15 ng까지 定量이 可能하였으며, HPLC보다는 經濟的, 時間的 예민도에서 월등하나 含量이 높은 aflatoxin 定量에서는 column에 동일량이 흡착되기 때문에 상대적으로 HPLC가 손실이 적었고, *Aspergillus niger* ATCC 32656에서 본 바와 같이 微量의 aflatoxin 定量에서는 ELISA가 우수함을 알 수 있었고, 또한 aflatoxin B₁은 微量에서도 人類에 큰 影響을 미치고 있으므로 많은 양보다는 微量의 aflatoxin B₁ 存在가 有毒性이나 病原性에 더욱 關聯이 깊기 때문에 더욱더 微量까지의 定量을 위한 ELISA의 應用에 대해 계속 研究해야 될 과제라 사료된다.

結 論

서울시내 穀類商으로부터 수집한 試料에서 眞菌을 分離 同定하여 眞菌의 分布度를 確認하였으며 HPLC와 ELISA를 이용하여 aflatoxin B₁의 검출능에 대해 實驗을 實施한 결과 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 총 試料 100건중 分離된 眞菌株는 *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Alternaria*,

Cladosporium, *Fusarium*, *Circinella*, *Chrysosporium*, *Paecilomyces*, *Phoma* 등 11속 274株였다.

2. 試料에서 分離된 *Aspergillus flavus* 28株중 aflatoxin 生成 菌株은 6株였으며, 보리에서 分離된 *Aspergillus flavus*에서 aflatoxin B₁ 生成能이 21.8 µg/ml로서 가장 높았다.

3. aflatoxin B₁-oxime 化合物의 收得率은 75% 이었으며 生成된 化合物에 human serum albumin 을 結合시켜 New zealand white rabbit (*Oryctolagus cuniculus*)에 免疫한 結果 完全抗原으로서의 機能을 確認하였으며 5週째에 가장 높은 最高値의 抗毒素價를 生成하였다.

4. 生成된 抗毒素를 利用하여 direct competitive ELISA 方法으로 aflatoxin B₁을 定量한 結果 0.15 ng까지 定量可能하였으며 미량의 定量에서는 HPLC보다 ELISA가 더 우수함을 알 수 있었다.

REFERENCES

1. J. Forgacs and W.T. Carll; Adv. Vet. Sci., **7**, 273~282 (1962)
2. J.W. Newberne, W.S. Bailey and H.R. Seibold; J. Am. Vet. Med. Assoc., **127**, 59~62 (1955)
3. J.E. Burnside, W.L. Sippel, J. Forgacs, W.T. Carll, M.B. Atwood and E.R. Doll; Am. J. Vet. Res., **18**, 817~824 (1957)
4. K. Sargeant, A. Sheridan, J. O'Kelly and R.B.A. Carnaghan; Nature (London), **192**, 1096~1097 (1962)
5. R.D. Stubblefield, O.L. Shotwell and G.M. Shannon; J. Amer. Oil. Chem. Soc., **45**, 686~688 (1968)
6. E.V. Crisan and E. Mazzucca; Contrib. Boyce Thompson Inst., **23**, 361~364 (1967)
7. A.C. Beckwith and L. Stoloff; J.A.O.A.C., **51**, 602~608 (1968)
8. W.A. Pons Jr.; J.A.O.A.C., **51**, 913~914 (1968)
9. D.M. Miller, D.M. Wilson, R.D. Wyatt, J.K. Mckinney, W.A. Crowell and B.P. Stuart; J.A.O. A.C., **65**, 1~4 (1982)
10. E.C. Shepherd, T.D. Phillips, N.D. Heidelbaugh and A.W. Hayes; **65**, 665~671 (1982)
11. G.J. Diebold, N. Karny, R.N. Zare and L.M. Seitz; J.A.O.A.C., **62**, 564~569 (1979)
12. G.S. Moore, D.M. Jaciow; Mycology for the Clinical Laboratory, Reston publishing company inc., Printed in U.S.A., 38~41 (1979)
13. 일본약학회 편, 위생시험법 주해, 458~463 (1983)
14. P.D.G. Dean, P.H. Rowe and D. Exley; Steroids Lipids Res., **3**, 82~89 (1972)
15. J.J. Langone and H.V. Vunakis; J. Natl. Cancer Inst., **56**, 591~595 (1976)
16. J.S. Garvey, N.E. Cremer, D.H. Sussdorf; Method in Immunology, W.A. Benjamin Inc., (1980)
17. T.L. Fan and F.S. Chu; J. of Food protection, **47**, 263~266 (1983)
18. J.J. Pestka, Y. Li, W.O. Harder and F.S. Chu; J. A.O.A.C., **64**, 294~301 (1981)
19. T.C. Campbell, L. Stoloff; J. Agric. Food Chem., **22**, 1006 (1974)
20. 고춘명, 최대경, 유준; 대한미생물학회지, **10**, 39~51 (1975)
21. J.L. Albright, S.D. Aust, J.H. Byers, T.E. Fritz, B.O. Brodie, R.E. Olsen, R.P. Link, J. Simon, H. E. Rhoases and R.L. Brewer; J. Am. Vet. Med. Assoc., **144**, 1013~1019 (1964)
22. H. Hitokoto, S. Morozumi, J. Wauke, S. Sakai and H. Kurata; Appl. Microbiol., **36**, 252 (1978)
23. R. Barabolak, C.R. Colbrun and R.J. Smith; J.A. O.A.C., **57**, 764~766 (1974)
24. L. Allen; J.A.O.A.C., **57**, 1398~1401 (1974)
25. G.W. Engstorm, J.L. Richard and S.J. Cysewski; J. Agri. Food Chem., **25**, 833~836 (1977)
26. D.B. Nelson, R. Kimbrough, P.S. Landrigan, A. W. Hayes, G.C. Yang and J. Benanides; Pediatrics, **66**, 865~869 (1980)
27. D.W. Lawellin, D.W. Grant and B.K. Joyce; Appl. and Environ. Micro., 88~93 (1977)