

옥수수 중의 Zearalenone 분석을 위한 효소면역측정법

손동화^{1*} · 한성민 · 임선희 · 이인원 · 강신영²

농업생물신소재연구센터, 서울대학교 농업생명과학대학

¹한국식품개발연구원, 이화학연구부, ²충북대학교, 수의학과

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Zearalenone in Corn

Shon, Dong-Hwa^{1*}, Seong-Min Hahn, Sun-Hee Lim,
Yin-Won Lee and Shin-Young Kang²

Research Center for New Bio-Materials in Agriculture, College of Agriculture and Life Sciences,
Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

¹Division of Food Science, Korea Food Research Institute,
Songnam 463-420, Korea

²Department of Veterinary, Chungbuk National University,
Cheungju 360-763, Korea

Abstract — In order to develop an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for zearalenone (ZEA) in corn, we produced antisera by immunizing rabbits with ZEA-6'-carboxymethylloxime-BSA, purified polyclonal anti ZEA antibodies, and subsequently established a competitive indirect ELISA. The antibodies showed low cross-reactivity of 9.6~1.4% against ZEA analogues such as α -zearalenol, β -zearalenol, α -zearalanol, and β -zearalanol. From the standard curve of the ELISA for ZEA in corn, the detection range was found to be 0.3~1,000 ng/ml. When artificially contaminated corns were assayed by the ELISA, the average recovery of ZEA spiked to 30~1,000 ng/g was 109% (96~123%), although that of ZEA spiked to 10 ng/g was somewhat high (258%). The average coefficient of variation (CV) of the recovery was 18.0% (0.9~28.3%). When 9 corn samples naturally contaminated were assayed 3 times, the average CV of the determinations was 27.7% (9.3~52.4%). Therefore, the ELISA was elucidated to be a practical tool for the detection of ZEA of 30 ng/g and more from corn.

Zearalenone(ZEA)은 *Fusarium graminearum* 등의 곰팡이가 옥수수나 보리에 서식하여 생산되며 가축의 성 성숙전 증후군(hyperestrogenic syndrom)을 유발하는 진균독소이다(1). Eppley 등(2)은 미국의 corn belt 지방에서 수집한 옥수수 사료중 17%에서 0.1~5.0 ppm 범위의 ZEA를 검출하였다. 또한 근년에 수입개방과 더불어 우리나라가 매년 엄청난 양의 옥수수를 수입하고 있음에도 불구하고(1992년, 661만톤), 옥수수중 ZEA 오염에 관한 수입검사 및 현황조사가 극히 미흡할 뿐만 아니라 법적인 규제가 없기 때문에 문제가 되고 있다. 외국의 경우 브라질(옥수수, 200 ppb), 루마니아(전식품, 30 ppb), 구소련(곡류 및 유지, 1000 ppb) 등에서 ZEA 오염 허용치를 설정하여 규제하고 있는 것과 대조적이다(3).

ZEA의 검출방법은 통상 고가의 장비나 시약을 필요로 하며 복잡한 전처리를 하여야 하기 때문에 다량의 곡물 시료로부터 ZEA를 검출하는 것은 쉬운 일이 아니다(4). 그러므로, 1980년대에 도입되기 시작한 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)는, 항체·항원 반응의 면역기법을 이용함으로써, 감도가 뛰어나고 신속·간편하면서 경제적인 분석법으로 개발되어 점차 널리 실용화되어가고 있는 실정이다(5). 이 분석법은 일회에 수백개의 시료를 동시에 분석할 수 있어, 특히 시료의 수가 많은 농산물 등의 분석에 매우 효율적이다. 이미 상업적인 검출 kit가 외국에서 생산판매되고 있으나, 이를 이용하여 많은 시료를 분석할 때는 고액의 외화가 소요될 것으로 예상된다. 또한, 국내에서 하 등(6)에 의하여 사료중의 ZEA 검출법이 개발되었으나 교차반응 등을 좀 더 개선할 여지가 있었다.

따라서, 본 연구에서는 특이성이 뛰어난 ZEA의

Key words: Enzyme-linked immunosorbent assay, zearalenone, corn

*Corresponding author

검출법을 개발하기 위하여, 특이항체를 생산·정제하고 간접법에 의한 ELISA 분석법을 확립하였다. 또한 옥수수 검출대상 곡물로 하여 시료중 ZEA 분석의 신뢰성을 검토하였으므로 다음과 같이 보고한다.

재료 및 방법

재료

Zearalenone(ZEA), α -zearalenol, β -zearalenol, α -zearalanol, β -zearalanol, bovine serum albumin (BSA), ZEA-6'-carboxymethyloxime-BSA(ZEA-BSA), Freund complete adjuvant(FCA), Freund incomplete adjuvant(FIA), Tween 20, goat anti-rabbit IgG-HRP conjugate 및 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS) 등은 Sigma사의 제품을 사용하였고, hydrogen peroxide, acetonitrile 등 기타의 시약은 GR 또는 EP 등급을 사용하였다. Microtiter plate는 Nunc사의 MaxiSorp®를, microplate reader로는 Bio-Tek Instruments사의 EL307C를 사용하였다. 옥수수 시료는 1992년 1월부터 10월까지 수집한 국내산 또는 외국산을 사용하였다.

특이항체 생산

실험동물로 New Zealand white 토끼를 3마리 사용하였다. ZEA-BSA를 멸균한 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.2)에 용해시켜 FCA와 함께 동량비로 유화시켜 마리당 500 μ g 씩의 면역원을 피하주사하였다(7). 이후 2~3주 간격으로 FIA와 함께 500 μ g 씩 4회 추가면역하고 면역 1주일 후에 귀의 정맥으로부터 채혈하였다. 항체가가 높은 항혈청을 함께 모아 다음 실험에 사용하였다.

항체의 정제

항 BSA항체의 제거: carrier protein인 BSA에 대한 항체를 제거하기 위하여 정량침강반응(8)에 의하여 항 ZEA항체와 반응하는 BSA의 최적량을 미리 구하고, 이를 기준으로 항 ZEA항혈청 100 ml에 5 mg의 BSA와 PBS를 첨가하여 용량을 2배로 하였다. 이를 잘 교반하고 37°C, 1시간 처리한 다음 4°C 에서 하룻밤 방치하고서 10,000×g, 10분간 원심분리하여 상침액을 회수하였다.

항체의 정제: 황산암모늄 침전법(9) 및 이온교환 크로마토그래피로 항체를 정제하였다. 즉 항 BSA 항체를 제거한 항 ZEA항혈청에 포화황산암모늄 농도가 50% 되게 처리하여 얻은 침전을 원심세척 후 1 M tris-Cl buffer(pH 8.0)에 용해시키고 0.05 M tris-

Cl buffer(pH 8.0)에 투석하였다. 이후 DEAE-Sephadex A-50에 의한 이온교환 크로마토그래피로 정제하여 얻은 IgG 분획을 항 ZEA항체로 사용하였다.

효소면역측정법(ELISA)

간접법에 의한 경쟁적 효소면역측정법(competitive indirect ELISA)을 실시하였다. 즉, coating buffer (0.02 M tris, 0.15 M NaCl, pH 9.0)에 용해시킨 ZEA-BSA(2 μ g/ml) 100 μ l를 well에 채우고 4°C 에서 하룻밤 방치하여 coating 한 다음, wash buffer(0.02 M tris, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.4) 180 μ l로 3회 세척 후 시료용액(wash buffer에 용해된 ZEA 용액)과 항 ZEA항체(0.1% BSA를 포함한 wash buffer로 1/10,000 희석)의 1:1 혼합액을 100 μ l 넣고 상온에서 1시간 경쟁적인 항원·항체반응을 시켰다. Wash buffer로 3회 세척 후, 2차 항체인 goat anti-rabbit IgG-HRP(wash buffer로 1/10,000 희석)를 넣고 상온에서 1시간 방치하였다. Wash buffer로 3회 세척 후 기질 용액(0.1% ABTS, 0.1 M citric acid phosphate buffer, pH 4.0, 0.02% H₂O₂ 사용 직전 첨가)을 넣고 상온에서 30분간 발색시킨 다음 반응정지액(0.1% NaN₃)을 100 μ l 첨가하였다. Microplate reader로 파장 405 nm에서 각 well의 흡광도를 측정하였다. 하나의 시료에 대하여 3개씩의 well을 사용하여 얻어진 흡광도의 평균값으로 분석하였다.

항 ZEA항체의 교차반응

유사독소에 대한 항 ZEA항체의 교차반응을 ELISA로 분석하였다. 즉, wash buffer에 농도별로 희석한 유사독소를 ZEA 대신에 사용하였다. 교차반응의 정도는 항 ZEA항체에 대한 ZEA-BSA의 결합을 50% 저해하는 ZEA의 농도를, ZEA-BSA의 결합을 50% 저해하는 유사독소의 농도로 나눈 %값으로 나타내었다.

옥수수시료의 처리 및 분석

시료 중에 함유된 ZEA를 추출하기 위하여 분쇄옥수수 10 g에 추출용매인 75% acetonitrile 50 ml을 가하여 1시간 교반 후 Whatman 42번 여과지를 통과시켰다. 이 여과액을 wash buffer로 10배 희석하여 시료용액으로 사용하였다. 표준곡선의 작성을 위한 독소용액은, ZEA이 오염되지 않은 분쇄옥수수 추출액의 희석액에 ZEA 표준품을 농도별로 첨가한 것을 사용하였다. 표준곡선의 작성을 위한 실험은 매 차례 시료의 분석시마다 행하였다. 한편, spike test는 오염되지 않은 분쇄옥수수 10 g에 acetonitrile에 용해한

일정량의 표준독소(ZEA)를 첨가하여 상온에서 하룻밤 방치한 다음, 위와 같은 방법으로 추출하고 분석에 사용하였다. 이때 ZEA의 인위적 오염은 10, 30, 100, 300, 1,000 ng/g 농도로 각각 3개씩 처리하였다.

결 과

항 ZEA항체의 특성 및 교차반응

ZEA-BSA를 토끼에 면역하여 얻은 항혈청을 정제하여 최종적으로 분리한 IgG 항체의 항체가를 ELISA로 분석하였을 때, 그 titer가 60만배 이상으로 양호하였으며 분석에 적합한 항체의 최종희석배율은 1/20,000로 나타났다. 이 항 ZEA항체를 이용한 ELISA의 제반문제를 검토한 결과 확립한 최적조건 및 실험과정은 실험방법에 명시한 바와 같다.

그리고, 항 ZEA항체의 ZEA 유사독소와의 교차반응을 ELISA로 검토하였을 때, Fig. 1에 나타난 바와 같이 대체로 ZEA >> α-zearalenol > α-zearalanol > β-zearalenol >> β-zearalanol의 순으로 독소가 항 ZEA항체와 잘 결합하므로써 microplate에 coating 된 ZEA-BSA에 대한 항체의 결합을 저해하였다.

또한 그 결합을 50% 저해하는 ZEA의 농도는 22 ng/ml이고 유사독소인 α-zearalenol, β-zearalenol, α-

zearalanol 및 β-zearalanol의 농도는 각각 230, 430, 260 및 1600 ng/ml로 나타났다. 따라서 항 ZEA항체에 대한 이들 유사독소의 교차반응율은 ZEA를 100%로 하였을 때 각각 9.6%, 5.1%, 8.5% 및 1.4%로 낮았다 (Table 1).

추출용매의 희석배율에 대한 검토

위에서 얻은 표준곡선은 ZEA이 wash buffer 하에 존재하는 경우를 나타내고 있다. 그러나, 실제 옥수수시료중의 ZEA를 75% acetonitrile로 추출하여 competitive indirect ELISA로 분석하면 결합반응시 유기용매의 영향으로 안정된 분석결과를 얻지 못하는 문제가 있다. 따라서, 추출액(추출용매)을 wash buffer로 희석할 필요가 있어, 1 : 2(acetonitrile, 37.5%)

Table 1. Cross-reaction of zearalenone(ZEA) and its derivatives with antibodies binding to ZEA-BSA by competitive indirect ELISA

Toxin	Toxin to inhibit 50% Ab binding, ng/ml	Cross-reactivity* %
Zearalenone	22	100.0
α-Zearalenol	230	9.6
β-Zearalenol	430	5.1
α-Zearalanol	260	8.5
β-Zearalanol	1600	1.4

*Conc. of ZEA to inhibit 50% Ab binding / Conc. of toxin to inhibit 50% Ab binding × 100

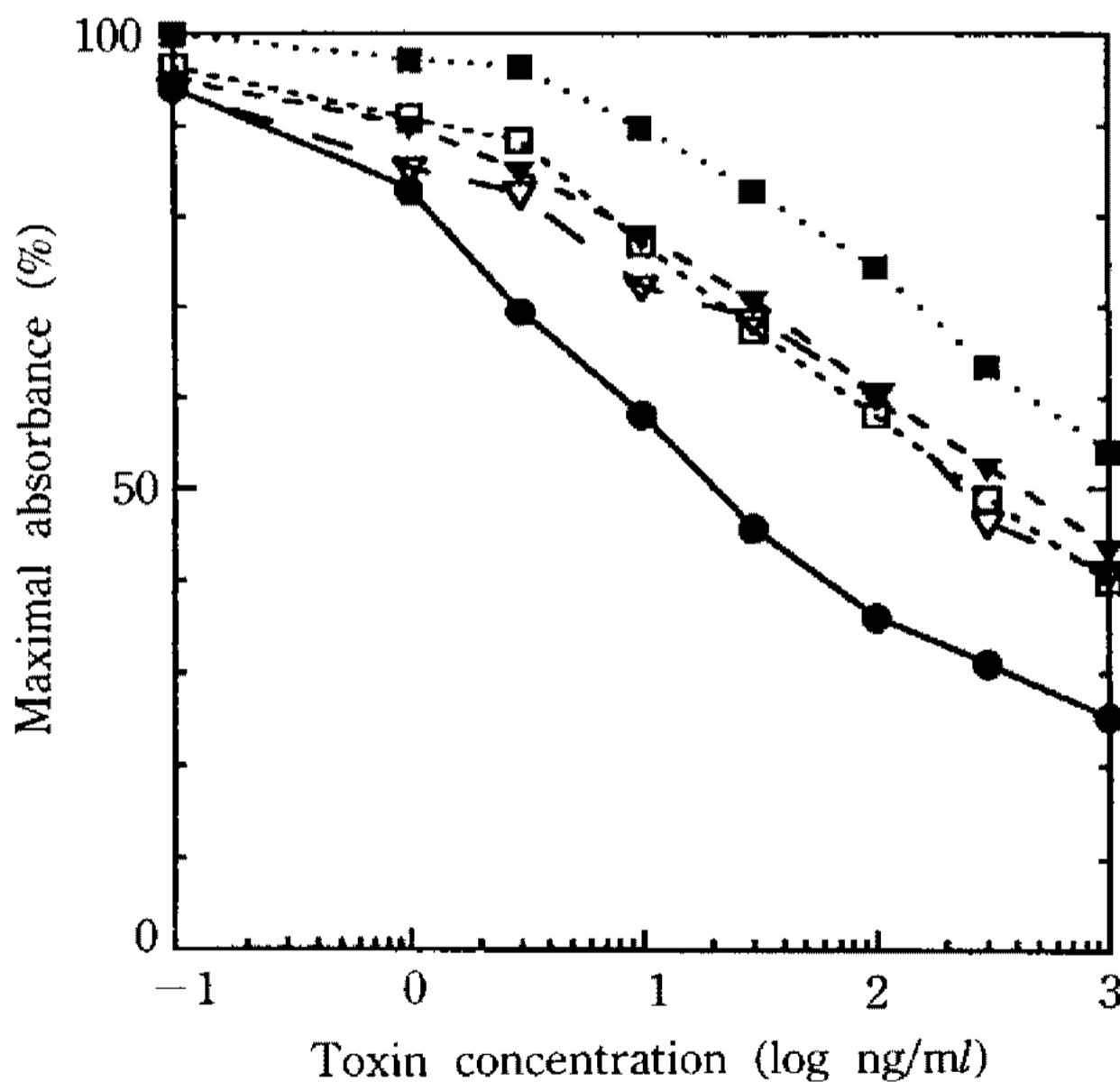


Fig. 1. Reactivity of anti-zearalenone(ZEA) antibodies toward zearalenone analogs as determined by competitive indirect ELISA.

In the presence of the analogues, reduced absorbance resulted from inhibition of antibody binding to ZEA-BSA.

●: Zearalenone, ▽: α-Zearalenol, ▼: β-Zearalenol, □: α-Zearalanol, ■: β-Zearalanol

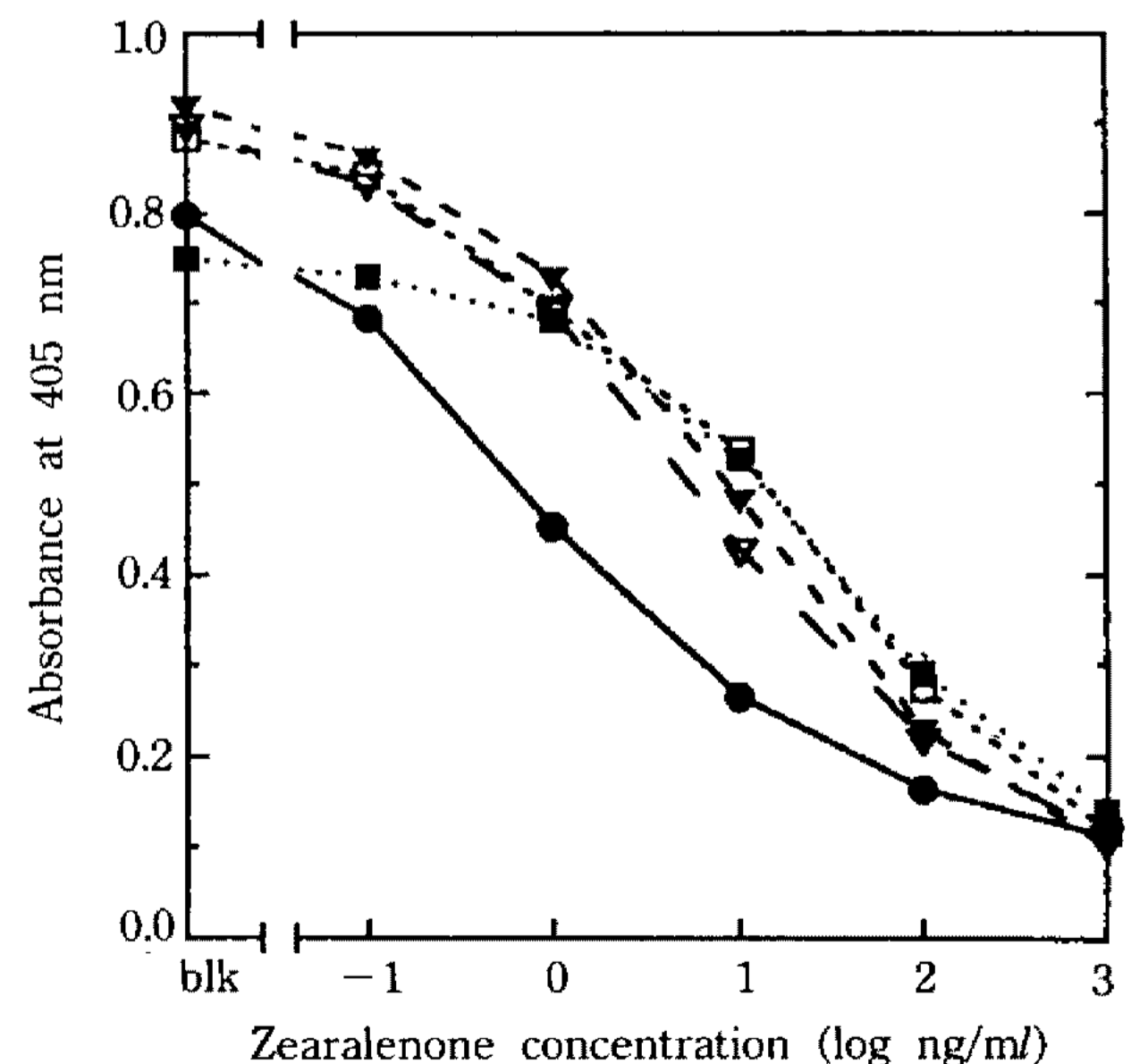


Fig. 2. Effect of dilution of extraction solvent on competitive indirect ELISA.

75% acetonitrile was diluted with wash buffer.

■: 1 : 2, □: 1 : 3, ▼: 1 : 4, ▽: 1 : 5, ●: 1 : 10

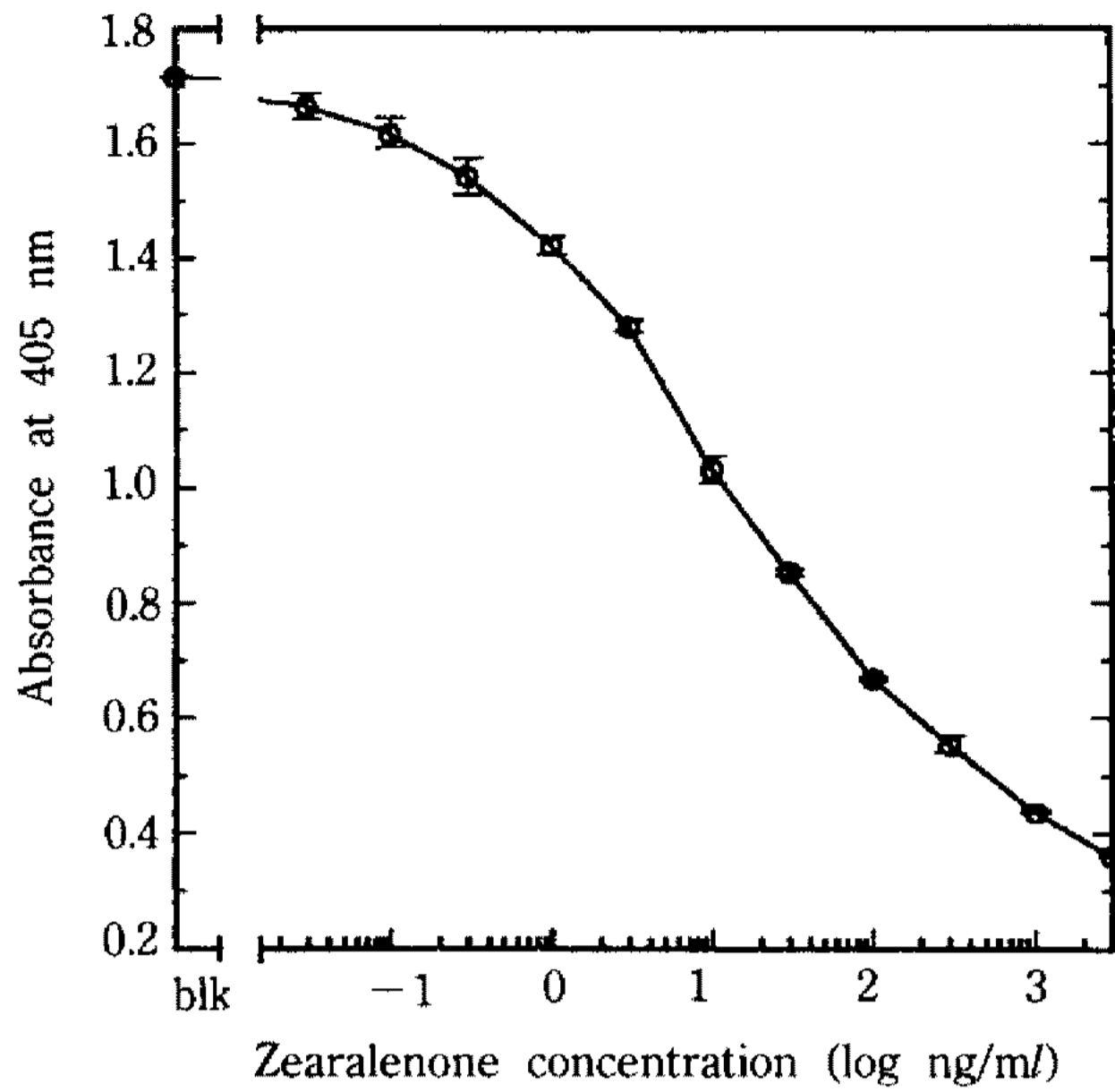


Fig. 3. Standard curve by competitive indirect ELISA for zearalenone in corn.

Each point and bar represents an average and standard deviation of 3 determinations.

~1 : 10(7.5%) 범위 내에서 최적희석배율을 검토하였다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 추출용매를 wash buffer로 1 : 10으로 희석하였을 때 저농도의 ZEA (0.1~10 ng/ml)에서 경사가 가장 급격하여 이 희석배율이 ZEA의 검출에 가장 적합함을 알 수 있었다. 그러므로 이후의 옥수수시료중 ZEA 분석시는 용매 추출 후 wash buffer로 10배 희석하여 ELISA를 행하였다.

인위적으로 오염시킨 시료의 분석

ELISA에 의한 옥수수시료의 분석시 사용할 ZEA의 표준곡선을 작성하였다. Fig. 3에서와 같이 대체로 0.3~1,000 ng/ml(ppb)의 ZEA를 측정할 수 있는 양호한 곡선을 나타내었다.

한편, 옥수수시료는 추출용매에 의하여 5배, 추출 후 완충용액으로 10배 희석되므로 시료중의 독소는 최종 50배 희석되는 셈이다. 따라서, 실제 옥수수시료중 ZEA의 검출한계는 대체로 15 ng/g 가량으로 추정되어, 실험방법에 명시한 바와 같이 10~1,000 ng/g의 표준독소를 5단계로 오염시켜 spike test를 행하였다. 그 결과, Table 2에 나타난 바와 같이 분석치는 오염치에 대하여 평균 139.1%의 회수율을 나타내었으나, 10 ng/g의 저농도 오염의 경우(회수율, 258.0%)를 제외하면 평균 109.4%의 양호한 회수율을 나타내었다. 또한, 분석치의 상대적인 분산정도(CV)는 0.9~28.3%로 평균 18.0%이었다. 이 결과로부터 본 연구에서 확립한 ELISA로 옥수수시료에 오염된 약

Table 2. Recovery of zearalenone from artificially contaminated corns as determined by competitive indirect ELISA

Added, ng/g	Detected, ng/g ¹	Recovery, %
10	25.8± 4.3 (16.7)	258.0
30	36.8± 10.4 (28.3)	122.7
100	111.2± 20.0 (18.0)	111.2
300	329.5± 3.0 (0.9)	109.8
1000	939.7± 245.0 (26.1)	94.0
Overall recovery, %	139.1 (109.4) ²	
SD	60.1 (10.2) ²	
Mean CV, %	18.0 (18.3) ²	

¹Mean± SD(CV, %) of 3 replicates in 3 wells on a microtiter plate.

²Calculated between 30 and 1000 ng/g levels

Table 3. Quantitation of zearalenone from naturally contaminated corns by competitive indirect ELISA

Sample No.	Detected, ng/g			
	1st	2nd	3rd	Mean± SD(CV, %)
1	1450	1900	1300	1550± 255 (16.5)
2	1350	1350	1100	1267± 118 (9.3)
3	360	195	600	385± 166 (43.1)
4	130	120	185	145± 29 (20.0)
5	105	140	290	178± 80 (44.9)
6	44	63	145	84± 44 (52.4)
7	44	68	46	53± 11 (20.8)
8	60	55	40	52± 8.5 (16.3)
9	34	24	18	25± 6.6 (26.4)
Mean CV, %	27.7			

30 ng/g 이상의 ZEA을 분석가능함을 알 수 있었다.

자연적으로 오염된 시료의 분석

자연적으로 오염된 9점의 옥수수시료를 분석한 수치를 Table 3에 나타내었다. 동일한 분쇄시료를 독립적으로 3차례 분석한 결과인데, 분석치는 25~1550 ng/g이었고 CV 값의 범위가 9.3~52.3%로 다소 높게 나타난 경우도 있으나 평균 27.7%로 비교적 양호한 분석 결과를 보였다.

고 찰

일반적으로 hapten-BSA를 면역하여 얻은 다클론 항체를 이용한 간접법 ELISA에서는 coating 항원으로서 hapten-keyholelymphet hemocyanin 또는 hapten-ovalbumin을 사용하므로써 carrier protein인

BSA에 대하여 유기된 항체(항 BSA항체)의 영향을 배제시킨다. 그러나, 본 연구에서는 면역원인 ZEA-BSA를 ELISA의 coating 항원으로 사용하기 위하여, 일차로 정량면역침강반응에 의하여 항 BSA항체를 제거하고 이차로 경합반응시 0.1%(최종 0.05%)의 BSA를 첨가하므로써 coating 항원인 ZEA-BSA에 대한 항 BSA항체의 작용을 거의 완전히 배제시킬 수 있었다.

기존의 연구에서 다클론 항 ZEA항체는 유사독소와의 교차반응이 비교적 높게 보고되고 있다. 유사독소중에서도 α -zearalenol과의 교차반응이 모든 경우에 가장 높으며, 그 정도가 33%(10), 50%(11), 100%(12), 168%(6), 280%(13) 등으로 보고되었다. 본 연구에서는 α -zearalenol과의 교차반응이 9.6%로, 그리고 β -zearalenol, α -zearalanol 및 β -zearalanol과의 교차반응도 8.5~1.4%로 낮아 매우 양호하여(Table 1), ZEA를 특이적 검출할 수 있는 ELISA 방법이 확립되었다. 이처럼 본 연구에서 준비한 항 ZEA항체가 낮은 교차반응을 나타낸 까닭은, 비교실험을 하지 않아서 정확히 알 수는 없으나 아마도 항혈청의 정제를 통하여 ZEA에 대하여 특이성이 높은 항체가 분리되었기 때문으로 생각된다.

또한, 기존의 연구에서 검출한계가 양호한 경우에 0.5 ng/ml(13), 다소 떨어지는 경우에 10 ng/ml(10) 등으로 보고되었는데, 본 연구에서는 검출한계가 약 0.3 ng/ml로 높은 감도의 분석법으로 나타났다(Fig. 3). 그러나 본 연구에서 확립한 ELISA는 간접법으로서 시료의 분석시는 최종 50배 희석되므로 감도가 이보다 떨어지게 되어, 실제로 옥수수시료를 분석하였을 때 검출한계는 약 30 ng/ml 가량으로 나타났다. 그럼에도 불구하고, ZEA의 독성은 다른 진균독소에 비하여 비교적 약하고 세계적인 허용기준치가 가장 낮은 루마니아의 경우도 30 ng/g이므로, 본 ELISA는 옥수수시료중 ZEA의 분석에 충분히 활용가능한 것으로 생각한다.

결론적으로 본 연구를 통하여 개발한 ZEA의 분석 방법은 유사독소와의 교차반응이 매우 낮고 검출감도도 비교적 양호할 뿐 아니라 신속·간편하며 경제적이어서, 한꺼번에 여러 점의 옥수수시료중 ZEA 오염을 일차적으로 분석하는데(screening) 매우 유용하게 활용할 수 있는 것으로 나타났다.

요 약

효소면역측정법(ELISA)에 의한 옥수수중의 zearalenone(ZEA) 정량법을 개발하기 위하여, ZEA-6'-car-

boxymethyloxime-BSA(ZEA-BSA)을 토끼에 면역하여 생산한 다클론항체를 정제하고 간접법에 의한 분석법(competitive indirect ELISA)을 확립하였다. 이 항체는 ZEA의 유사독소인 α -zearalenol, β -zearalenol, α -zearalanol 및 β -zearalanol에 대하여 9.6~1.4%의 낮은 교차반응을 보였다. ZEA 표준품에 대하여 작성한 표준곡선으로부터 이 분석법에 의한 ZEA의 검출농도는 0.3~1,000 ng/ml 정도로 나타났다. 분쇄옥수수에 ZEA를 인위적으로 오염하여(10~1,000 ng/g) ELISA 분석치와 비교하였을 때, 10 ng/g의 저농도에서는 그 회수율이 높게 나타났지만(258%) 30 ng/g 이상 1,000 ng/g의 농도에서는 평균 109%(94~123%)로 양호하였으며, 오염농도별 각 분석치의 상대적인 분산도(CV)는 평균 18.0%(0.9~28.3%)였다. 한편 자연오염된 9개의 옥수수시료를 3차례 분석하였을 때, CV가 다소 크게 나타난 경우도 있었으나 평균 27.7%(9.3~52.4%)로 대체로 근사한 수치를 나타내었다. 따라서 본 효소면역측정법은 30 ng/g 이상의 ZEA이 오염된 옥수수시료의 분석에 활용가능한 것으로 나타났다.

감사의 말

본 연구는 1991년 한국과학재단의 목적기초연구과제로 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. Hidy, P.H., R.S. Baldwin, R.L. Greasham, C.V.L. Kelth, and J.R. McMullen. 1977. Zearalenone and some derivatives: production and biological activities. *Adv. Appl. Microbiol.* 22: 59-82.
2. Eppley, R.M., L. Stoloff, M. Truckness, and M.W. Chung. 1974. Survey of corn for Fusarium toxins. *JAOAC* 57: 632-635.
3. Yoshizawa, T. 1990. Fusarium mycotoxins: recent topics. *Jpn. J. Food Microbiol.* 7: 57-62.
4. 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, New York.
5. Pestka, J.J. 1988. Enhanced surveillance of foodborne mycotoxins by immunochemical assay. *JAOAC* 71: 1075-1081.
6. 하정기, 정덕화, 김성영. 1991. 가축사료중 zearalenone 분석을 위한 enzyme-linked immunosorbent assay 법의 개발. *한국식품위생학회지* 6: 111-117.
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. 日本生化学会 編. 1986. 免疫生化学研究法. Pp. 1-83. 續生化学实验讲座: Vol. 5, 東京化学同人. 東京.
 9. Fulton, S.P. 1989. *The Art of Antibody Purification*, Pp. 32-33. Amicon Division, W.R. Grace & Co., Conn.
 10. Pestka, J.J., M.-T. Liu, B. Knudson, and M. Hogberg. 1985. Immunization of swine for production of antibody against zearalenone. *J. Food Prot.* **48**: 953-957.
 11. Liu, M.-T., B.P. Ram, L.P. Hart, and J.J. Peatka. 1985. Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the mycotoxin zearalenone. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 332-336.
 12. Thouvenot, D. and R.F. Morfin. 1983. A radioimmunoassay for zearalenone and zearalanol in human serum: production, properties and use of porcine antibodies. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 16-23.
 13. Warner, R., B.P. Ram, L.P. Hart, and J.J. Pestka. 1986. Screening for zearalenone in corn by competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Agric. Food Chem.* **34**: 714-717.

(Received June 10, 1994)