

국내외 기술정보

# 식품내 진균독소분석을 위한 면역화학적 방법의 평가와 응용

이항범 · 손동화  
이화학연구부

## 요 약

면역분석법(immunoassay)은 aflatoxin류, deoxynivalenol(DON), zearalenone(ZEA), fumonisin류 등을 포함하는 다양한 진균독소분석에 적용되고 있다. 이들 분석법을 이용하여 여러 종류의 matrix내에 존재하는 물질들을 분석할 수 있다. 그리고 많은 시료를 빨리 분석해야 하는 경우에 이 방법이 적용되고 있다. 상업적인 면역화학적 분석키트들은 흔히 검출감도(sensitivity), 특이성(specificity), 재현성(reproducibility), 비용(cost), 안정성(stability), 편리성(ease of use) 등의 관점에서 평가된다. 실험실적으로 품질보증을 위하여 표준곡선과 양성대조구 등에 대한 사전 검토가 필수적이다. 또한 높은 농도의 분석물의 경우에는 matrix에서 기인한 간섭때문이 아닌지를 구분하는 것도 중요하다. 본문에서 곡류와 곡류가공품 및 특정의 감시대상물 질내 aflatoxin류, DON, ZEA 그리고 fumonisin류와 같은 진균독소의 분석에 면역화학적 방법을 사용하여 얻어진 공동연구의 결과에 대한 해석기준이 소개된다. 또한 yes/no로 구분해야 하는 정성시험의 결과해석에 필요한 기준이 제시된다. 진균독소의 면역분석법을 평가하기 위한 몇몇 기준들과 그 방법들을 감시도구로 사용한 예는, 식품중의 잔류농약을 검출하기 위한 접근방법과 유사한 모델로서 활용될 수 있을 것이다.

## 1. 서 론

진균독소(mycotoxin)는 다양한 농산물내 곰팡이에 의해 생성되는 독성이 매우 강한 2차 대사산물이다. 이들 진균은 재배포장에서 그리고 수확후 저장기간 중에 기주를 침입하기도 한다. 이들이 식물체내에 기생할 수 있는 능력은 미생물의 밀도, 식물체의 종류, 온도, 조직의 상해정도, 곤충의 활

성, 습도, 수확 등과 같은 요인들에 좌우된다. 여러 종류의 진균이 사람과 가축에 독성을 나타내는 진균독소를 생산한다. 자연오염된 식품과 사료에서 문제가 되는 높은 농도로 검출되는 진균독소는 aflatoxin류를 포함하여 deoxynivalenol(DON), zearalenone(ZEA), fumonisin류가 포함된다. 이들 독소들은 옥수수, 땅콩, 목화씨, 호두, 밀, 보리, 귀리와 같은 곡류 등에 존재한다.

1960년대 초에 밝혀진 aflatoxin류는 인·축에 급·만성독성을 일으키는 것으로 잘 알려져 있다. 주요 관심대상이 되는 aflatoxin유도체는 B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> 그리고 M<sub>1</sub> 등이다. DON은 돼지에 vomitoxin으로 알려져 있다. ZEA는 일종의 estrogenic metabolites로 돼지에 있어 사료섭취거부 및 성숙전성징후군(hyperestrogenism)을 일으킨다. 새로운 진균독소그룹의 하나인 fumonisin류는 1988년에 최초로 분리 및 특성규명이 되었으며 주로 *Fusarium moniliforme*와 *F. proliferatum* 등의 진균에 의해 생산된다. *F. moniliforme*는 미국 산 옥수수에서 발견되는 가장 일반적인 진균중 하나이다. 최근에 7가지의 fumonisin이 확인되었으며 FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub>, FB<sub>3</sub>, FB<sub>4</sub>, FA<sub>1</sub>, FA<sub>2</sub> 그리고 FC<sub>1</sub> 등이 있다. FB<sub>1</sub>은 말에 뇌백질연화증(equine leukoencephalomalacia; ELEM)을 그리고 돼지에 폐수종(lung edema)을 일으키는 것으로 알려져 있다. 또한 남아프리카에서 fumonisin은 식도암(oesophageal cancer)을 일으키는 원인물질일 가능성이 매우 높은 것으로 보고되고 있다.

## 2. 진균독소의 분석

진균독소에 오염된 식품과 사료의 소비를 최소화하기 위해서는 진균독소의 분석이 필수적이다. 그러나 이 문제는 간단하지가 않다. 가장 중요하게 여겨지고 있는 진균독소에서 요구되는 1/10억 단위(ppb) 수준에서 곡류내 독소의 농도를 알아내는 것은 쉽지 않다. 체계적인 접근이 필요하며 이러한 접근은 일반적으로 다음과 같은 것들이 포함된다. 즉, 비교적 많은 수의 시료, 그것도 부피와 입자크기를 작게하여 잘 다룰 수 있는 양으로 만들어 분석하는 것이다. Aflatoxin의 오염여부시험을 위한 곡물시료의 수집방법은 USDA의 규정을 따른다. 옥수수, milo 및 기타 곡류에서는 적어도 5-25kg의 시료가 필요하다. 분석을 위한 대표적인 시험구를 준비하기 위하여 시료를 뺏아 혼합시킨다. 이것은 시험구내 독소의 농도를 본래 수집된 시료에서

와 같은 농도로 만들어 주는 것이다. 펠렛형 사료의 경우 1kg의 시료가 적당한데 이는 오염된 진균독소가 사료제조동안에 일정하게 분산되었을 것으로 생각되기 때문이며, 이와 유사하게 가공, 분쇄 및 혼합사료의 경우는 더욱 작은 양이 적당하다.

## 2.1 방법의선택

분석을 위해서는 확실한 독소표준품을 준비하고 이용가능한 방법을 사용하며 필요에 따라서는 적절한 방법을 선택하여 사용한다. 분석방법을 선택하는 데는 다음과 같은 점들을 고려할 필요가 있는데 분석시료수, 시간, 위치, 기기비용, 안전성, 폐기물 처분 그리고 숙련된 분석가의 활용 등이다. 항체를 이용한 새로운 면역화학적 분석방법은 간단하고, 특이적이며 고감도의 특성을 나타낸다. 진균독소들은 저분자물질로서 단독으로는 실험동물의 항체생산을 유기할 수 없으므로 대부분의 경우 유도체를 만들어 이들을 carrier protein에 결합시킨다. 적절한 면역원의 준비는 진균독소에 대한 특이항체의 생성과 면역분석법의 개발에 있어서 중요한 단계의 하나이다.

## 3. 면역화학적 방법

진균독소의 검출을 위하여 개발된 주요 면역화학적 방법은 다음의 세가지이다. 즉 radioimmunoassay(RIA), enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) 그리고 immunoaffinity column assay 등이다. 이중 앞의 두가지 방법은 항체의 결합부위에 대해 유리 진균독소와 표식된 진균독소간의 경쟁에 기초하고 있다. Immunoaffinity assay의 경우, 항체가 agarose bead에 공유적으로 결합되어 있다. 이 affinity column은 분석물이 항체-agarose packing체와 결합하도록 함으로써 분석물의 농축수단으로 활용된다. 용출후에 분석물은 몇 단계를 더 거치게 된다. 현재 ELISA와 immu-

noaffinity column assay기술은 RIA보다 일반적으로 더 많이 사용된다. 고체 식품은 전형적으로 수용메탄올로 추출하고 분석전에 물로 희석함으로써 항체와 enzyme conjugate의 단백질 구조가 본래대로 유지되도록 한다.

### 3.1 상업적인 immunoassay kit

농산물내 진균독소의 검출을 위한 상업적 immunoassay kit들이 여러종류 팔리고 있다. 이들 키트들에는 시험을 수행하는데 필요한 시약, 재료 그리고 설명서가 포함되어 있다. Immunoassay kit들의 제조회사와 키트형태에 관한 목록은 Table 1과 같다.

Table 1. Commercially Available Mycotoxin Immunoassay Kits

Mycotoxin	Company	Type
Aflatoxins	Environ. Diag. Sys.	card
	Idexx	well, probe
	Idetak	well
	Inter. Diag. Sys.	cup
	Neogen	well
Deoxynivalenol	Vicam	column
	Environ. Diag. Sys.	card
Fumonisins	Neogen	well
	Vicam	column
Zearalenone	Environ. Diag. Sys.	card
	Neogen	well

이들 키트들은 신속한 정성적 동정이나 정량분석이 가능하도록 만들어져 있다. 이 목록은 단지 원저자의 실험실(FDA)이 접수한 진균독소용 키트에 관한 정보로서 모든 것들을 다 포함하는 것은 아니다.

## 4. 상업적 immunoassay kit의 평가 기준

현재 상업적 immunoassay kit를 평가하는 전형적인 기준은 없다. 몇몇 기관에서 평가를 위한 지침을 개발하는데 노력해 왔다. 즉 이들 단체들로는 Association of Official Analytical Chemists International(AOACI), U.S. Environmental Protection Agency(EPA), U.S. Department of Agriculture(USDA), 그리고 U.S. Food and Drug Agency(FDA)가 있다. Table 2는 aflatoxin에 대한 immunoassay kit를 평가하는데 USDA의 FGIS(Federal Grains Inspection Service)가 사용하고 있는 몇가지 기준들을 요약한 것이다.

### 4.1 초기평가

FDA 연구실에서는 비용, 장비, 감도, 이용성, 안정성, 설명서의 명확성, 품질관리, 기존 방법과의 비교(가능하면), 비용, 장비에 중점을 두고서 제조사로부터 얻는 정보들을 평가한다. 이 검토에 의하여 초기의 평가는 이루어진다. 그 다음으로 키트들을 구입하여 정확하게 평가한다.

이와는 약간 다른 접근이 USDA의 FGIS실험실에서 시도된다. 관심대상의 분석물을 검출할 수 있는 시험키트를 제조하는 모든 제조사는 시험키트의 성능에 대한 정보를 제공해야 한다는 경고가 Federal Register로 부터 공포되어 있는데, 이들 data들은 FDA 실험실에 제공된 설명서의 경우와 유사한 기준에 따라 검토된다. 또한 이들 키트들은 명시된 분석방법(well, cup 그리고 column 등)에 따라 다양한 시험방법을 사용해본 경험이 있는 실험실에서 시험된다. Table 2에서 나타낸 바와 같이 FGIS가 정한 기본적인 분석시간과 안전성의 요구를 만족시킬 수 있는 키트들을 구입하여 여러 FGIS 현장조사실험실에서 공동으로 시험을 행한다.

**Table 2. Design Criteria and Test Performance Specifications for Quantitative Aflatoxin Test Kits**

<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Time required for completion : 30min.</li> <li>2. Capability of analyzing for B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, and G<sub>2</sub>.</li> <li>3. Applicability : corn, corn meal, etc.</li> <li>4. Acceptable accuracy, precision limits.</li> </ol>		
Aflatoxins added	Accuracy	Precision
ng/g	ng/g	ng/g
0	≤7.0	4.0
10	±8.0	6.0
20	±10.0	8.0
30	±12.0	10.0
320	±60.0	32.0
<ol style="list-style-type: none"> <li>5. Should not include toxic solvents and reagents.</li> <li>6. Comparative accuracy of test kits on corn samples naturally contaminated with aflatoxins at about 20 and 100ng/g</li> <li>7. The limit of detection of test kits, ≤5ng/g.</li> <li>8. Insensitivity to temperature change, 18–30℃.</li> <li>9. Stability data to support expiration date.</li> <li>10. Free of matrix interference.</li> </ol>		

#### 4.2 정밀평가

FDA 실험실에서는 면역화학적 및 전통적인 분석 방법을 평가하기 위하여 체계적인 접근방법을 이용한다. 이러한 접근방법을 보면, 정성적인 방법을 평가하기 위한 접근에는 감도와 특이성의 평가가 포함되는 반면에, 정량적인 방법을 위한 접근에는 정확성, 간결성 그리고 특이성에 관한 평가가 포함된다. 두가지 시험군이 사용되고 있는데 그것은 대조구와 자연적으로 오염된 시료구를 말한다. 이들 시험시료들은 기준방법에 의하여 분석된다. 대조구 시험시료는 관심대상의 진균독소가 없는 것이며 검출한계 이하의 수준으로 함유된 것이다. 그리고 자연적으로 오염된 시료는 시험목표수준, 특정수준 또는 작용수준에 가까운 진균독소가 함유된 것이다. 세 번째의 시험시료 즉, spiked test 시료는 대

조구에 이미 알고 있는 분석물의 양을 첨가하여 준비한다. 첨가 농도의 수준은 시험목표수준, 목표수준의 반 그리고 목표수준의 1/2 내지 두배로 한다. FGIS 실험실의 경우, 관심대상의 각 곡류 matrix에 대하여 FGIS 공동연구로 얻어진 data는 기술적으로 요구되는 최소한의 성능기준을 설정하는데 활용된다. Table 2의 item 4와 7은 옥수수 분석시 정량적인 aflatoxin 분석시험 키트를 위한 성능기준의 예가 된다. 다시말해 해당 키트는 관심대상 분석물의 공식적인 시험을 개시할 수 있다는 FGIS의 의도를 산업체에 알려주는 공개적인 발표인 셈이다. 이러한 요구는 인위적으로 오염시킨 시료와 자연적으로 오염된 시료 두가지 다의 분석을 포함한다. 정량적인 시험 키트의 경우 관심대상의 진균독소 수준이 고르게 시험범위를 지나 분포하게 된다. 정성적인 분석(yes 또는 no, positive 또는

negative) 키트의 경우 목표수준은 FDA에 의해 정해진 허용수준과 유사하다. FGIS 실험실에서는 성능기준에 부합되는지 조사하기 위하여 무작위 추출검사를 실시한다. 모든 성능요구와 확증시험(verification test)을 충족하는 시험키트들은 공식적인 곡류조사에 활용될 수 있음을 인정받게 된다.

### 4.3 Immunoaffinity column을 이용한 정량방법

성능은 세 set 시험시료의 분석결과에 기초하여 평가된다. FDA에 의해 평가된 최초의 정량적인 방법은 옥수수, 땅콩 및 땅콩버터내의 aflatoxin 검출을 위한 immunoaffinity column 분석이었다. 이러한 연구결과는 사용된 방법의 정확성과 간결성이 적절한지를 보여주었다. 즉 첨가된 aflatoxin의 회수율은 평균 97-131%였고 변이계수(C.V.)는 20% 이하였다. 대조구에서 C.V.값이 70%로 높은 것은 땅콩과 땅콩버터내 극소량(2ng이하)의 aflatoxin이 존재하였던 것에 기인하였다. 검출한계에서의 표준편차는 이보다 높을 것으로 추측된다. 이 방법은 기준방법과 좋은 상관관계를 보여주었다.

이 방법은 국제적인 공동연구에 의해 더 많은 평가가 이루어졌다. 7개 국가의 11개의 실험실이 관여하여 수락할만한 결과를 얻었다. 이 방법으로 땅콩과 땅콩버터내 aflatoxin류의 분석을 위하여 336여개 시료를 분석하였다. 단지 2개의 땅콩시료에서 20ng/g 이상의 aflatoxin을 (분석상) 포함하는 것으로 밝혀졌다. 방법의 마지막 시험을 위하여 대표적인 분석자들로 하여금 이 방법으로 실제 시료를 분석하게 하였을 때 만족할만한 성능을 보였다.

위와 유사한 방식으로 fumonisin B<sub>1</sub>(FB<sub>1</sub>)에 대한 immunoaffinity column 방법이 평가되었다. 머지않아 공동연구가 이루어질 것이다. 이 방법은 통조림옥수수와 냉동 감미옥수수내 FB<sub>1</sub>을 조사하기 위하여 사용되었는데 1993년에 시험된 감미옥수수

시료의 36% 정도가 낮은 수준(4-350ng/g)의 FB<sub>1</sub>에 오염되어 있음이 밝혀졌다.

### 4.4 직접·경합 ELISA 방법

이 방법은 matrix 간섭에 민감하다. 대부분의 간섭물질은 항체의 분석물 인식에 영향을 주거나 또는 효소의 활성을 변화시킨다. Matrix에 의한 간섭효과를 검토하는 것은 대단히 중요하다. 곡류와 곡류가공품내 DON의 측정을 위한 Neogen사의 Veratox 시험키트의 성능을 확인하기 위하여 두가지 접근방법이 사용되었다. 첫째, 수도물내 DON의 표준곡선이 blank matrix 추출물내 DON의 표준곡선과 유사하다는 것이 밝혀졌다. 둘째, 분석시 발견되는 분석물(DON)의 양과 분석된 추출물의 부피와의 관계를 plot하여 조사하였다. 이때 그래프는 양자간에 좋은 linearity를 나타냈다. 이 방법은 1993년에 미 중서부지역으로부터 수집된 630개의 밀, 보리 시료를 분석하는데 사용되었다. 483개의 밀시료내 DON의 평균오염농도는 1.2 μg/g이었으며 그 범위는 0-18 μg/g을 나타냈다. 147개 보리시료내 DON의 평균오염은 2.7 μg/g이었으며 그 범위는 0-26 μg/g을 나타냈다. 이것은 예상치 않았던 것으로 1993년에 미 중서부의 많은 지역에서 비정상적으로 습한 기후로 인해 DON을 생성하는 *F. graminearum*의 대발생이 일어났다.

최근의 한 사건은 분석을 제대로 잘하는 것이 얼마나 중요한가를 잘 설명해준다. 1992년에 미국에서 그리스로 수출되던 건포도를 이전에 곡류분석을 위해 개발된 ELISA 방법으로 aflatoxin 오염여부를 조사하였을때 60ng/g의 aflatoxin이 함유된 것으로 나타났다. 그 건포도는 선적전에 HPLC분석에 의해 aflatoxin이 전혀 없는 것으로 나타났었다. 이 문제를 해결하기 위하여 영국에서 또 다른 LC로 다시 분석한 결과 본래 어떤 aflatoxin도 없는 것으로 밝혀졌다. 모든 분석키트들은 특정시료에 사용할 경우 분석성능을 확인할 필요가 있다. 새로운 분석방법과 기준방법간 분석성능에 관한 비

교연구를 하는 것이 중요하다. Aflatoxin은 건포도에서는 일상적으로 거의 발견되지 않기 때문에 분리된 독소의 존재를 확인하기 위한 질량분석법의 이용이 절대적으로 필요하다. 비록 aflatoxin이 옥수수, 땅콩, 목화씨 및 피스타치오 등에서 발견된다고 하더라도 화학적인 방법으로 aflatoxin의 존재를 확인하는 것이 바람직하다.

#### 4.5 정성적인 면역화학적 방법

정성적 방법의 성능은 어떤 목표수준에서 양성인지 음성인지를 정확히 동정함에 있어 검출감과 특이성에 의하여 일반적으로 평가된다. 감도는 어떤 목표수준에서 양성물질을 확인할 수 있는 능력으로 정의된다. 특이성은 음성의 시료를 목표수준 이하의 negative로서 확인할 수 있는 능력으로 정의된다. 일반적으로 각 spike 수준(농도)당 최소 15개의 시료가 사용된다. 만일 시험결과에서 양성 과 음성이 서로 뒤바뀐 것이 없다면 그 시험방법은 +/− 범주를 정확히 구분함으로써 모든 시험시료를 제대로 정성할 수 있다. 그러나 만일 시험결과가 그렇지 않다면 그 시험방법은 양성 과 음성을 정확히 구분할 수 없다.

#### 4.6 Operating characteristic curves (OC 곡선)

완벽한 정성적 시험은 어떤 목표수준의 양성시료를 음성으로 또는 목표수준이하의 음성시료를 양성으로 나타내지는 않음을 뜻한다. 그러나 실제의 시험은 여간해서 완벽하지 않다. 각각의 시험은 특별한 반응 패턴을 갖는 농도의존적이다. 통계적으로 이것은 operating characteristic(OC) 곡선을 사용하여 결정된다. OC곡선은 농도의 함수로서 양성율(즉, true positive+false negative)을 plot한다. 의양성율[false positive/(true negative+false positive)]도 농도의 함수이다. 의양성율은

그 농도가 목표수준(target level)에 접근할 때 항상 최고를 나타낸다. 좋은 성능을 보인 한 시험에서는 aflatoxin의 20ng/g의 목표수준에서 높은 진양성율(90% 이상)을 나타내었다. 옥수수, 밀 및 사료내 ZEA에 대해 500ng/g수준에서 yes/no 시험을 명확히 하기 위한 공동연구가 이루어졌다. 이때의 OC곡선은 500ng/g의 목표수준에서 낮은 양성율(75%)을 보였다. 그러므로 이 분석방법은 그 목표수준에서 시험하는데 실패하였다. 그러나 800ng/g에서 양성율은 96%이었다. 따라서 이 시험방법은 옥수수, 밀 및 사료내 800ng/g 이상의 ZEA에 대한 스크리닝 방법으로서 채택되었다.

### 5. 면역화학적 방법의 미래

면역분석법은 간편하고 특이적이며 단시간에 분석이 행하여 질 뿐만 아니라 최소한의 숙달훈련으로 시험이 가능하다. 이 방법은 분석화학자들에 의해 점차 채택되고 신뢰를 받고 있으며 기존의 방법에 대하여 경쟁력을 갖고 있다. 이러한 까닭은 이 방법이 전통적인 분석방법과 동일한 기준에 의하여 평가되며 표준곡선이 준비되고 spike된 시료의 분석에서 결과의 반복성과 회수율을 check하는 등 성능보장을 위한 일정한 과정을 거치기 때문이다. 면역분석법은 농산물에 있어서 특별한 위해물질의 잔류여부를 감시하기 위한 분석도구로서 점차 더 많이 사용되고 있다. 이들은 또한 TLC, LC 또는 GC 등 기존의 방법을 병용함으로써 더 큰 가치를 나타낸다. 면역분석법에 의한 새로운 농산물이나 식품에 대하여 얻어진 시험결과가 목표수준 이상(양성)이라면 그것은 기존의 다른 방법에 의하여 반드시 확증되어야 한다.

출처 : Mary W. Trucksess and Donald E. Koeltzow(1995) *In Immunoanalysis of Agrochemicals*(J. O. Nelson, A. E. Karu and R. B. Wong eds.). ACS Symposium Series No. 586, New York. Pp 326-34.