J. Fd Hyg. Safety 12(4), 281 - 287(1997)

ELISA에 의한 농산물중 Aflatoxin 잔류 조사

손동화 · 조명행*,† · 이문한*
*한국식품개발연구원, *서울대학교 수의과대학*

Aflatoxin Residues in Agricultural Commodities Determined by Direct ELISA

Dong-Hwa Shon, Myung-Haing Cho*,† and Mun-Han Lee*
Korea Food Research Institute, Kyonggi-Do 463-420, Korea
**College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea*

ABSTRACT—We have reported a sensitive, specific and simple direct competitive ELISA method to detect aflatoxin in agricultural commodities. We evaluated the ELISA for practical use to detect aflatoxins contaminated in the domestic and foreign agricultural commodities. The detection limits of the direct ELISA for residual aflatoxins in rice, pine nuts, corns, almonds, bean nuts, and pistachio were 10 ppb and in peanuts and cashew nuts were 20 ppb, which were elucidated from the standard curves of ELISA for aflatoxin fortified into the agricultural commodities. Residue studies of naturally contaminated aflatoxins in the agricultural commodities were also carried out by using direct ELISA. As the results of the studies, it was revealed that there were no residues of aflatoxins in 20 rice samples produced in south Korea, 20 pine nut samples in south Korea (9 samples), USA (1 sample) and China (10 samples), each of 20 almond, pistachio and bean nut samples in USA. However, aflatoxin residues were detected in corn samples imported from north Korea (350~585 ppb in 2 of 3 samples), from USA (109~326 ppb in 6 of 6 samples) and domestic corns (61~326 ppb in 7 of 17 samples). The toxins were contaminated in corn imported from USA for popcorn (17~20 ppb, in 3 of 10 samples) whereas no residues were detected in corn from south Korea and China. In case of cashew nuts imported from India, 11.4~23.1 ppb of aflatoxins were detected in 4 from 20 samples. Most of the contaminated foods were harvested before 1995. Thus, hygienic managements of the foods should be required during storage and circulation at market.

Key words □ Aflatoxin, ELISA, Agricultural commodity

진균독소(mycotoxin)는 곰팡이의 2차 대사산물로서 생성되는 독소이며 사람과 가축에 심각한 부작용을 초래하는 독성물질이나 이에 대한 연구는 1960년대 이후에야 비로소 본격적으로 수행되어 오고 있다. 즉 1960년 영국에서 *Aspergillus flavus*에 오염된 땅콩 사료로 인하여 10여만 마리의 칠면조가 떼죽음 당한 turkey X disease의 발생이 있었으며,[1] 이후 진균독소에 대한 연구가 본격적으로 행하여져 원인물질이 aflatoxin이었음이 밝혀져 농산물 등에서의 잔류 문제와 이의 허용치에 관한 관심이 고조되어 왔다.

전세계적으로 aflatoxin과 Fusarium 진균독소의 자연발생이 주로 문제가 되고 있는데 이들 두 독소의 발생 지역은 약간씩 다른 것으로 알려져 있다. Aflatoxin의 발생은 주로 고온 다습한 열대나 아열대 지방에서 주로 발견되며 Fusarium독소는 온대 지방에서 주로 발생된다고 보고되고 있다.[2] 현재 우리 나라의 수입 농산물의 원산지는 주로 미국, 중국 등 동남아시아지역을 포함한 온대 및 아열대지역이 주를 이루기 때문에 aflatoxin을 비롯한 Fusarium 독소에 의한 오염 가능성이 클 것으로 예견된다. 또한 Lee 등[3]과 Kim 등[4]의 최근 연구에 의하면 국내 농산물의 경우 aflatoxin 뿐만 아니라 Fusarium 독소에 의하여 심하게 오염되고 있다고 보고하고 있다. 하지만 UR의 타결에 의한 수입선의 다변화와 수입량의 급증에 따라 aflatoxin과 Fusarium 독소 모두 중요한

† Author to whom correspondence should be addressed.

오염원이 될 수 있으며 따라서 이와 같은 모든 진균독소에 대한 대비책을 세우는 것이 절실한 과제로 대두되고 있다.

Aflatoxin은 맹독성의 곰팡이 대사물질로서 농산물, 식품 등에 오염이 쉽게 될 수 있으며 특히 aflatoxin B_1은 가장 강력한 간장 발암물질로 알려져 있다.[5,6] 특히 아프리카와 아시아의 일부 지방에서 기본적인 필수 식품 중에 aflatoxin이 오염되어 있는 것으로 밝혀졌으며 이는 hepatitis B virus와 더불어 이들 지방의 월등히 높은 간암 발생의 주요한 원인으로 사료되고 있다.[2] 이 밖에 sporidesmin, luteoskyrin, cyclochlorotine, rubratoxin 그리고 sterigmatocystin 등의 독소들도 역시 간장에 심한 독성을 유발시키는 것으로 알려져 있다.[7] 그리고 ochratoxin, citrinin 등은 신장에 그리고 penitrem A, tremortin, patulin과 citreviridin 등은 신경계통 특히 중추신경계에 심한 손상을 야기시키는 것으로 보고되고 있다.[8] Fusarium 진균독소 역시 사람과 가축에 심각한 중독증을 초래할 위험성이 있으며 실제적으로 여러 나라에서 발생되고 있다. 미국의 moldy corn toxicosis,[9] 일본의 Akakabi-byo,[10] 그리고 소련의 alimentary toxic aleukia[11] 등은 모두 Fusarium 진균독소로 인해 발생된 중독증으로 알려져 있다. 우리 나라에서도 1963년 남부 지방에서 Fusarium속에 의한 맥류의 붉은 곰팡이 병으로 40~90%의 농산물 수확이 감소되는 동시에 사람 및 가축에 중독을 야기시켜 커다란 사회적인 문제로 대두된 바 있다. 현재까지 약 40여 가지 이상의 독소가 보고, 발견되었으며 이들에 의해 피부 독성, 소화 기관 및 순환기계의 출혈, 설사, 구토, 신경장애 등의 심각한 독성이 초래된다고 알려져 있다.[12] 진균독소에 의한 급성 독성 외에 그 피해의 또 다른 특징은 미량으로 장기간 인체에 노출되어 종양성 질병, 최기형성, 생식독성 혹은 면역독성 등을 유발할 수 있으나 질병의 원인을 추적하기 어렵다는 점이다. 따라서 이와 같이 심각한 중독 현상을 일으키며 또한 사회적인 문제점을 야기시킬 가능성이 농후한 진균독소들에 대한 연구 및 이들 독소들을 보다 용이하고 체계적이며 간편하게 탐지할 수 있는 획기적인 분석 방법의 개발이 절실하게 요구되고 있다.

1970년대로부터 우리 나라 일부 학자들에 의해서 변질미와 메주를 비롯한 발효식품에서 aflatoxin의 검출을 보고하여[13] 이들 진균독소에 대한 사회적 인식이 한결 높아 졌으나 아직까지도 국내에서 진균독소에 관한 연구는 Kim 등[14,15]의 Fusarium속 곰팡이에 관한 일련의 연구를 제외하고는 거의 전무한 실정이며 aflatoxin의 오염도 조사 및 aflatoxin에 대한 ELISA개발 등의 연구가 단편적으로 이루어 졌으나 아직은 실용화되지 못하고 있다.

현재 국내에서는 두류와 nut류에 대하여 aflatoxin만을 규제하고 있을 뿐 기타 진균독소에 대하여는 공정분석법이 설정되어 있지 않고 있다. 더욱이 현재 소개되어 있는 대부분의 방법은 추출, 정제과정이 매우 복잡하고 연구개발자에 따라서 다양한 전처리과정을 거치는 것으로 되어 있어 진균독소의 확인 정량에 많은 시간이 소모되기 때문에 대상 시료(농산물)의 종류에 따라서 효율이 높은 방법의 선발이 요구되고 있다. 뿐만 아니라 예비실험으로 간이검사를 실시하여 확인 정량하는 검사법도 체계화되어 있지 않은 실정이다. 이와 같은 단점을 보완하여 용이하고 간편하게 그리고 동시에 여러 가지 진균독소를 검색할 수 있는 기술의 개발 정립이 절실하게 요구되고 있다.

따라서 이 연구에서는 본 연구진이 개발한 aflatoxin에 대한 항체를 이용한 ELISA기법을 국내산 및 수입산 두류와 곡류에 적용하여 이 기법의 활용성을 검색함과 동시에 이들 농산물에서의 오염도를 조사하는데 그 목적이 있다.

재료 및 방법

시료 및 시료 채취

본 연구에서 aflatoxin 잔류 분석에 사용한 검사 시료는 국내에서 생산한 것과 수입한 것을 대상으로 하였다. 시료의 종류와 각 산지별 시료수는 Table 1과 같다. 다음의 농산물에 대하여 직접 ELISA로 표준곡선을 작성하여 aflatoxin에 대한 검출감도를 조사하고 이들 식품에서의 잔류량을 조사하였다. 시료는 모두 1995년 10월에서 12월 사이에 일반 시장에서 채취하였다.

쌀—경기 지역에서 생산되어 수도권에서 시판되고 있는 것과 충청지역에서 생산되어 충남지역에서 시판되고 있는 것 각 10례에 대하여 잔류분석을 실시하였다.

땅콩—국내에서 생산한 11례, 국내에서 유통되는 원산지 불명의 묵은 것 6례, 북한산 3례에 대하여 잔류분석을 실시하였다.

잣—가평지역에 생산한 잣 9례, 미국산 잣 1례 그리고

Table 1. Samples and producing areas

Samples	Areas	No. of samples	Samples	Areas	No. of samples
Rice	S. Korea		Peanuts	S. Korea	11
	Kyung-gi	10		N. Korea	3
	Chung-chung	10		Unknown	6
Pine nuts	S. Korea	9	Corn	S. Korea	5
	U.S.A.	1		U.S.A.	10
	China	10		China	5
Bean nut	U.S.A.	20	Almond	U.S.A.	20
Pistachio	U.S.A.	20	Cashew nut	India	20

중국산 잣 10례에 대하여 잔류분석을 실시하였다.

아몬드 — 미국산 아몬드 20례에 대하여 잔류분석을 실시하였다.

옥수수 — 정선, 홍천, 승주, 중원 및 정읍에서 생산한 옥수수 각 1례씩, 중국산 옥수수 5례 그리고 미국산 옥수수 10례에 대하여 잔류분석을 실시하였다.

띠두콩 — 미국산 띠두콩 20례에 대하여 잔류분석을 실시하였다.

피스타치오 — 미국산 피스타치오 20례에 대하여 잔류분석을 실시하였다.

캐슈너츠 — 인도산 캐슈넛츠 20례에 대하여 잔류분석을 실시하였다.

시료 전처리

시료중에 오염된 aflatoxin은 methanol 수용액으로 추출하였다. 즉, 시료 50 g에 60% methanol 250 m*l*을 가하고 mixer로 1분간 균질화시켰다. 이 균질액에 동량의 증류수를 가한 다음 여과하여 여과액을 대상으로 ELISA를 실시하였다.

표준곡선을 작성하기 위하여 위에서 기술한 방법에 따라 각종의 시료에 대하여 aflatoxin을 추출한 다음 여과액을 immunoaffinity column에 통과시켜 만들었다. 즉, 여과액 10 m*l*을 immunoaffinity column(Rhone-Poulenc Diagnostics, USA)에 가하고 분당 2 m*l*의 유속으로 통과시킨 다음 용출액을 40°C에 보관하면서 표준곡선 작성용 aflatoxin 제거 시료로 사용하였다.

ELISA에 의한 표준곡선 작성

쌀, 땅콩, 잣, 옥수수, 아몬드, 띠두콩, 피스타치오 및 캐슈넛츠에 대하여 위에서 기술한 방법에 따라서 methanol 수용액으로 aflatoxin을 추출하여 immunoaffinity법에 의하여 aflatoxin을 제거한 용출액에 aflatoxin 표준액을 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1,000 및 10,000 ppb되게 가하여 다음에 기술한 방법에 따라 ELISA를 실시한 후 흡광도를 측정하여 표준곡선을 작성하였다. 표준곡선은 aflatoxin을 첨가하지 않은 것의 흡광도를 B_0 그리고 aflatoxin 표준액을 첨가한 것의 흡광도를 B로하여 표준액의 각 농도별로 B/B_0 %를 산출하고 표준액의 농도에 따른 이 비율의 변화를 표준곡선으로 나타내었다. 생산지가 다른 시료에 대하여는 산지별로 위에서와 같은 방법으로 전처리한 다음 표준곡선을 작성하여 그 표준곡선 양상을 비교하였다.

ELISA에 의한 잔류분석

ELISA용 항체 및 특성 — 본 실험에서는 손 등[16,17]이 개발한 aflatoxin에 대한 항체를 사용하였다. 즉, 이 항체는 토끼에서 생산한 polyclonal antibody로서, 항혈청중의 carrier protein에 대한 항체를 제거하고, ammonium sulfate 침전법 및 DEAE-Sephadex A-50에 의한 ion-exchange chromatography 정제한 것을 사용하였다. 이 항체는 aflatoxin B_1에 100%, G_1에 34%, B_2에 13% 그리고 G_2에 3%의 교차반응을 보인다.

Aflatoxin B_1-Enzyme 접합체의 제조 및 정제

직접 ELISA로 aflatoxin을 분석하기 위하여 aflatoxin B_1과 carboxymethyl-amine을 유기용매중에서 반응시켜 aflatoxin oxime을 합성하고 이것을 silica gel column에 통과시켜 정제하였다.[18,19] 정제한 oxime을 TLC법에 의하여 확인한 다음 여기에 EDPC와 horseradish peroxide를 가하여 반응시켜 항체-효소 접합체를 합성하였다. 이 접합체를 투석법에 의하여 탈염한 다음 직접 ELISA에 사용하였다.[19]

직접 ELISA

흡착용 완충액(0.02 M Tris, pH 9.0)에 항체를 1,000배 희석하여 100 μ*l*씩을 ELISA plate의 well에 가하여 하룻밤 동안 정치시켜 항체를 흡착시켰다. 이어서 세척용 완충액(0.02 M Tris, pH 7.4, 0.05% Tween 20)으로 2회 세척한 후 0.1% gelatin 용액으로 빈자리를 봉쇄하였다. 여기에 methanol 추출시료 50 μ*l*와 항체-효소 접합체(1,000배 희석액) 50 μ*l*를 가하여 1시간 동안 반응시킨 다음 기질인 OPD와 과산화수소액을 가하여 20분간 발색시켰다. 이어서 3N 염산액으로 반응을 중지시킨 다음 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

표준곡선을 작성하기 위한 실험에서는 위의 방법중 methanol 추출 시료 대신에 aflatoxin B_1을 0에서 10,000 ppb 농도되게 가한 것을 사용하였다.

시료중 aflatoxin 잔류량의 계산

시료중의 aflatoxin 잔류량은 B/B_0 %에 의하여 컴퓨터 프로그램 MicroCal Origin(MicroCal사, version 3.0)으로 산출한 다음 희석계수 10을 곱하여 계산하였다. 즉, 표준곡선을 작성하기 위하여 조제한 aflatoxin제거 시료에 aflatoxin을 첨가하지 않은 것의 흡광도를 B_0 그리고 각 시료의 흡광도를 B로 B/B_0 %를 계산하고 이 수치에 의하여 표준곡선에서 잔류량을 계산하였다. 생산지가 다른 시료에 대하여는 산지별로 aflatoxin제거 시료를 만들어 B_0 흡광도를 측정하였다. 잔류조사시 추출시료에 대하여는 3반복으로 ELISA를 실시하여 흡광도를 구한 다음 그 평균치로 잔류량을 산출하였다.

결과 및 고찰

곰팡이 독소에 오염된 식품으로부터 사람의 건강을 지키기 위하여는 농작물의 재배과정, 수확 후 저장, 유통과정에서 독소의 생성을 억제하거나 생성된 독소를 제거하여야 한다. 그러나 현재까지 이와 같은 방법으로 독소 생성을 억제하거나 생성된 독소를 파괴하는 효율적인 방법은 개발되어 있지 않은 실정이다. 따라서 오염된 독소를 분석하여 오염된 식품의 섭취를 사전에 예방하는 것이 현재로서는 최선의 방법이다. 이러한 이유로 세계 각국에서는 잔류허용기준을 설정하고 독소에 대한 공정분석법을 채택하고 있다.

특히 aflatoxin은 강력한 발암성 물질로서 세계 각국에서 농산물, 우유 그리고 원료 사료에 잔류허용기준을 설정하고 있다. 우리 나라의 경우 잠정허용기준으로서 곡류, 두류, 땅콩, 견과류 및 그 단순 가공품(분쇄, 절단 등)에 대하여 aflatoxin B_1으로서 10 ppb까지 허용하고 있고 원료사료의 경우 50 ppb 그리고 배합사료의 경우 20 ppb를 허용한계로 정하고 있다. 공정분석법은 박층크로마토그래피에 의한 정성 및 정량분석법과 TFA 유도체화에 따른 형광검출기를 사용한 HPLC 정량법을 택하고 있다. 이들 방법은 복잡한 유기용매 추출법과 clean-up 정제법 혹은 유도체화 과정을 거치기 때문에 일시에 다량의 시료를 처리하는데는 어려움이 있다.

이러한 이유로 최근에 신속, 정확하게 곰팡이 독소를 정량할 수 있는 방법들이 개발되고 있다. 특히 면역화학적 측정법이 시료에 대한 응용범위가 넓고, 특이성이 크며, 검출감도가 예민할 뿐만 아니라 그 기법이 단순하여 일시에 다량의 시료를 정성 혹은 정량 가능하기 때문에 관심의 대상이 되고 있다. Kawamura 등[20]과 Ram 등[21]은 땅콩과 peanut butter에서, Chu 등[22]은 옥수수와 peanut butter에서, El-Nakib 등[23]은 옥수수, 밀 그리고 peanut butter에서, 그리고 Ueno[24]는 peanut butter에서 고감도로 aflatoxin을 검출할 수 있는 ELISA기법을 개발하였다. 국내에서는 김[25]을 비롯한 다수의 연구진에 의하여 aflatoxin 검출용 ELISA 기법을 개발하였으나 실용화되지 못하고 있는 실정이다. 최근 손 등[16,17]은 aflatoxin에 대한 검출감도가 0.2~20 ppb인 직접 ELISA 기법을 개발하여, 수입 곡물중에 응용하여 회수율을 측정하고 HPLC에 의한 분석 결과와 비교하여 그 실용성을 증명한 바 있고 이 기법을 workshop을 통하여 학계, 연구계 그리고 산업계에 소개한 바 있다.[26]

본 연구에서는 이와 같은 연구 결과를 바탕으로 국내산 및 미국, 중국, 북한 혹은 인도에서 수입한 다양한 종류의 농산물을 대상으로 농산물 종류별로 표준곡선을 작성하여 검출감도를 비교하여 그 활용성을 입증하고 아울러 잔류조사를 실시하여 오염실태와 유통과정에서의 문제점이 있는지 조사하였다.

시료에서의 aflatoxin 표준곡선 작성

본 연구대상의 쌀, 땅콩, 잣, 아몬드, 옥수수 띠두콩, 피스타치오, 캐슈넛츠을 비롯한 모든 샘플에 60% methanol 수용액을 가하여 균질화한 다음 증류수로 2배 희석하여 immunoaffinity column에 통과시켜 그 용출액에 aflatoxin B_1 표준액을 0에서 10,000 ppb되게 가하여 직접 ELISA에 의하여 흡광도를 측정한 후 aflatoxin에 대한 표준곡선을 작성한 결과 ahems 샘플에서 대동소이하게 0.01에서 1 ppb 사이의 농도에서는 상대적으로 낮은 농도 의존적인 변화를 보인 반면 1 ppb(시료중의 잔류량 기준으로 10 ppb) 이상의 농도에서는 높은 농도 의존적 흡광도 변화를 보였다(Fig. 1).

잔류조사

상기의 표준곡선을 이용하여 표준곡선에서 흡광도 비율 변화가 뚜렷한 90 B/B_0%(시료 기준으로 15 ppb 상응량) 이하의 흡광도 비율을 양성으로 하였을 때 국내산 햅쌀 20례 모두에서 aflatoxin의 잔류를 측정할 수 없었다(Table 2). 이에 반하여 국내산 및 북한산 땅콩의 경우는 흡광도 비율변화가 뚜렷한 80 B/B_0 %(시료중의 잔류량 기준으로 20 ppb 이상) 이하의 흡광도 비율을 양성으로 하였을 때 관찰한 바

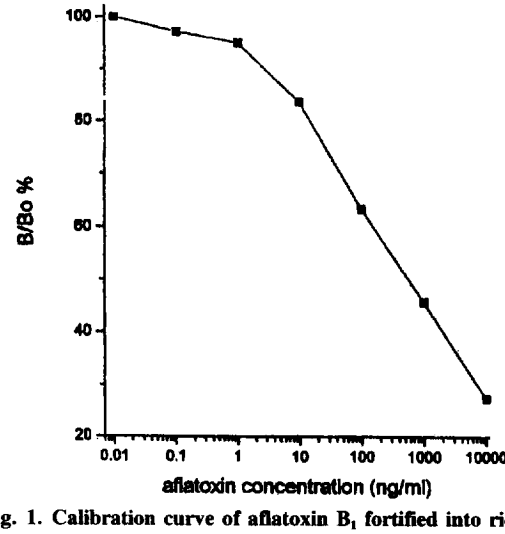

Fig. 1. Calibration curve of aflatoxin B_1 fortified into rice. The remaining calibration curves show similar pattern (Figures are not shown). Aflatoxin B_1 was extracted with 60% methanol solution and diluted 2 folds by distilled water. The toxin contaminated naturally in the extract was removed by antibody-ligand affinity chromatography and then toxin standards were spiked into the extract.

북한산 시료 3례 중 2례에서 350 및 585 ppb가 검출되었고, 국내에서 유통되는 원산지불명의 묵은 땅콩 6례중 6례 모두에서 109~326 ppb가 검출되었다. 그러나 국내산 햇땅콩 11례에 대하여 조사하였을 때 1례에서만 61 ppb가 검출되었다(Table 2).

국내산 미국산 및 중국산 잣에 대한 분석은 흡광도 비율변화가 뚜렷한 90 B/B_0 %(시료중의 잔류량 기준으로 10 ppb 이상) 이하의 흡광도 비율을 양성으로 하였는데 가평산 잣 9례, 미국산 1례 그리고 중국산 10례 모두에서 음성으로 나타났다(Table 2). 미국산 아몬드 역시 흡광도 비율변화가 뚜렷한 90 B/B_0 %(시료중의 잔류량 기준으로 10 ppb 이상) 이하의 흡광도 비율을 양성으로 하였을 때 미국산 아몬드 20례 모두에서 음성으로 나타났다(Table 2). 국내산, 중국산 및 미국산 옥수수도 흡광도 비율변화가 뚜렷한 90 B/B_0 % (시료중의 잔류량 기준으로 10 ppb 이상) 이하의 흡광도 비율을 양성으로 하였을 경우 국내산 옥수수 5례 및 중국산 옥수수 5례에서는 모두 음성인 것으로 판명되었으나 이에 반하여 미국산 옥수수(팝콘용 묶은 것)는 총 10례중 3례에서 17~20 ppb가 검출되어 약 30%가 aflatoxin에 오염되었음을 밝혀주고 있다(Table 2). 미국산 띠두콩은 흡광도 비율변화가 뚜렷한 90 B/B_0 %(시료중의 잔류량 기준으로 15 ppb 이상) 이하의 흡광도 비율을 양성으로 하여 검출하였는데 분석 샘플 20례 모두에서 음성으로 나타났다(Table 2). 미국산 피스타치오에 대한 분석은 흡광도 비율변화가 뚜렷한 85 B/B_0 %(시료중의 잔류량 기준으로 10 ppb 이상) 이하의 흡광도 비율을 양성으로 하여 실시하였는데 역시 20례 모두에서 음성으로 나타났다(Table 2). 인도산 캐슈넛츠도 흡광도 비율변화가 뚜렷한 85 B/B_0 %(시료중의 잔류량 기준으로 20 ppb 이상) 이하의 흡광도 비율을 양성으로 하여 검출한바 20례중에서 4례에서 20.2~27.3 ppb가 검출되었다(Table 2).

Table 2. Aflatoxin residues in agricultural commodities determined by direct ELISA

Items	Areas	No. of samples	No. of positive	Range (ppb)
Rice	S. Korea	20	0	<10
Peanuts	S. Korea	11	1	61
	N. Korea[1]	3	2	350, 585
	Unknown[1,2]	6	6	109~326
Pine nuts	S. Korea	9	0	<10
	USA	1	0	
	China	10	0	
Corn	S. Korea	5	0	17~20
	USA[1,3]	10	3	
	China	5	0	
Almond	USA	20	0	<10
Bean nuts	USA	20	0	<10
Pistachio	USA	20	0	<10
Cashew	India	20	4	20.2~27.3

[1] Commodities harvested in 1994 or earlier years.
[2] Obtained from domestic retail market and maybe not harvested in S. Korea.
[3] Corns sold for popcorn.

Kawamura 등[20]은 땅콩과 peanut butter에서 aflatoxin을 60% methanol로 추출하여 ELISA로 분석하였을 때 5 ppb까지 검출 가능하다고 보고하였으며, Ram 등[21]은 땅콩과 peanut butter에서 aflatoxin을 70% methanol로 추출하여 ELISA로 분석하였을 때 5~10 ppb까지 검출 가능하다고 보고하였다. Chu 등[22]은 옥수수와 peanut butter에서 aflatoxin을 chloroform 단독 혹은 hexane과 55% methanol로 추출하여 ELISA로 분석하였을 때 3~5 ppb까지 검출 가능하다고 보고하였으며, El-Nakib 등[23]은 옥수수, 밀 그리고 peanut butter에서 hexane과 55% methanol로 추출하여 ELISA로 분석하였을 때 5~10 ppb까지 검출 가능하다고 보고하였고, Ueno[24]는 peanut butter에서 chloroform과 수용액으로 추출하였을 때 1 ppb까지 고감도로 aflatoxin을 검출할 수 있는 ELISA기법을 개발하였다.

본 연구에서 오염된 aflatoxin을 60% methanol로 추출한 다음 증류수로 2배 희석하여 immunoaffinity chromatography에 의하여 aflatoxin을 제거한 다음 그 용출액을 대상으로 aflatoxin 표준액을 가하여 표준곡선을 작성하였을 때 쌀, 옥수수, 잣, 아몬드, 띠두콩, 피스타치오에서는 10 ppb까지 검출 가능하였고, 땅콩과 캐슈넛츠의 경우 20 ppb까지 검출 가능하였다. 우리 나라에서의 aflatoxin잠정 잔류허용치가 10 ppb인 점을 감안하다면 본 연구에서 사용한 ELISA법을 검색법으로 활용 가능한 것으로 판단된다. 특히 시료 처리에 필요한 시료 마쇄기 등의 관련 장비가 충분히 갖춰지고 단일 종류의 시료인 경우 한 사람의 술자가 8시간에 100건 이상의 시료를 처리할 수 있었다. 위의 식품에 대하여 잔류조사를 실시한 결과 국내산 햅쌀, 국내산 및 미국산 잣, 미국산 아몬드, 띠두콩 및 피스타치오에서는 aflatoxin이 검출되지 않았으나, 북한산 묵은 땅콩과 국내에서 유통되는 원산지 불명의 땅콩에서 상당량의 aflatoxin이 검출되었다. 그리고 묵은 것으로 보이는 미국산 팝콘용 옥수수와 인도에서 수입된 캐슈넛츠에서 aflatoxin이 검출되어 유통과정에서 오염도가 증가할 수 있으며 특히 열대 혹은 아열대 지역에서 수입되는 것에서 오염도가 높은 것으로 추정되었다. 수입 식품의 경우 bulk food 형태로 시판되는 것은 소비자가 상품 가치와 위생상태를 관능적으로 판단할 수 있는 장점이 있으나, 유통과정에서 위생상의 문제점을

야기할 것으로 여기어 진다. 소포장으로 유통되는 것 중에도 포장이 부실하거나 원산지와 수확 연도가 명시되지 않은 것 및 용량 등의 규격이 명시되지 않은 것이 유통되고 있어 수입단계에서 철저한 오염검사와 더불어 유통중의 관리에 보다 세심한 주의를 요하는 것으로 판단된다.

감사의 글

본 논문은 1995년도 보건의료기술개발사업비의 지원으로 수행된 연구결과의 일부이며 이에 감사드린다.

국문요약

본 연구에서는 국내산 쌀, 국내산 및 북한산 땅콩, 국내산, 미국산 및 중국산 잣 및 옥수수, 미국산 아몬드, 띠두콩 및 피스타치오 그리고 인도산 캐슈넛츠를 대상으로 각 시료의 종류 및 원산지별로 aflatoxin에 대한 표준곡선을 작성하여 본 연구진이 개발한 직접 ELISA기법에 의한 검출감도를 농산물 별로 비교하고 그 오염도를 조사하였다. 표준곡선을 작성하기 위하여 오염된 aflatoxin을 60% methanol로 추출한 다음 증류수로 2배 희석하여 immunoaffinity chromatography에 의하여 aflatoxin B_1을 제거한 다음 그 용출액을 대상으로 aflatoxin 표준액을 가하여 표준곡선을 작성하였을 때 쌀, 옥수수, 잣, 아몬드, 띠두콩, 피스타치오, 땅콩 등 시료에서 10 ppb까지 그리고 캐슈너츠에서는 20 ppb까지 검출 가능하였다. 우리 나라에서의 aflatoxin 잠정 잔류허용치가 10 ppb인 점을 감안하다면 본 연구에서 사용한 ELISA법을 검색법으로 충분히 활용 가능한 것으로 판단된다. 특히 시료 처리에 필요한 시료 마쇄기 등의 관련 장비가 충분히 갖춰지고 단일 종류의 시료인 경우 한 사람의 술자가 8시간에 100건 이상의 시료를 처리할 수 있었다. 위의 식품에 대하여 잔류조사를 실시한 결과 국내산 햅쌀, 국내산 및 미국산 잣, 미국산 아몬드, 띠두콩 및 피스타치오에서는 aflatoxin이 검출되지 않았으나, 묵은 것으로 여기어지는 북한산 땅콩과 국내에서 유통되는 원산지불명의 땅콩 및 일부 국내산에서 aflatoxin이 검출되었다. 그리고 묵은 것으로 보이는 미국산 팝콘용 옥수수와 인도에서 수입된 캐슈넛츠에서 aflatoxin이 검출되어 유통과정에서 오염도가 증가하며 특히 열대 혹은 아열대 지역에서 수입되는 것에서 오염도가 높은 것으로 추정되었다. 수입 식품의 경우 bulk food 형태로 시판되는 것은 소비자가 상품 가치와 위생상태를 관능적으로 판단할 수 있는 장점이 있으나, 유통과정에서 위생상의 문제점을 야기할 것으로 여기어 진다. 소포장되어있는 것 중에도 포장이 부실하거나 원산지가 명시되지 않은 것, 용량 등의 규격이 명시되어 있지 않은 것이 유통되고 있어, 수입검사의 철저와 유통중의 관리에 주의를 요한다.

참고문헌

1. Kraybill, H.F. and Shimkin, M.B.: Carcinogenesis related to foods contaminated by processing and fungal metabolites. *Adv. Cancer Res.*, **8**, 191-249 (1964).
2. Yeh, F.S., Yu, M.C., Mo, C.C., Luo, S., Tong, M.J. and Henderson, B.E.: Hepatitis B virus, aflatoxins and hepatocellular carcinoma in Southern Guanxi, *China. Cancer Res.*, **49**, 2506-2509 (1989).
3. Lee, Y.W., Mirocha, C.J., Schroeder, D.J. and Walser, M. M.: TDP-1, A toxic component causing tibial dyschondroplasia in broiler chickens, and trichothecenes from Fusarium roseum 'Grasminearum'. *Appl. Environm. Microbiol.*, **50**, 102-107 (1985).
4. Kim, K.H., Lee, Y.W., Mirocha, C.J. and Powlosky, K.J.: Isoverrucarol production by Fusarium oxyporum CJS-12 isolated from corn. *Appl. Environm. Microbiol.*, **56**, 250-253 (1990).
5. Wogan, G.N.: Aflatoxin carcinogenesis, in 'Methods in Cancer Research', Vol. VII, Academic Press, New York, 309 (1973).
6. Wogan, G.N., Paglialienga, S. and Newberne, P.M.: Carcinogenic effect of low dietary levels of aflatoxin B_1 in rats. *Fd. Cosmet. Toxicol.*, **12**, 681 (1974).
7. Lillehoj, E.B.: Natural occurrence of mycotoxins in feeds; Pitfalls in determination, *in 'Interactions of Mycotoxins in Animal Production'*, Washington, D.C., National Academy of Sciences, 139-156 (1979).
8. Pier, A.C., Richard, J.L. and Cysewski, S.J.: Implications of mycotoxins in animal disease, *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **176**, 719-725 (1980).
9. Hsu, I., Smally, E.B., Strong, F.M. and Ribelin, W.E.:

Identification of T-2 toxin in moldy corn associated with a lethal toxicosis in dairy cattle. *Appl. Environm. Microbiol.*, **24**, 684-690 (1972).

10. Forsythe, D.M., Yoshizawa, T., Morooka, N. and Tuite, J.: Emetic and refusal activity of deoxynivalenol to swine. *Appl. Environm. Microbiol.*, **34**, 547-552 (1977).
11. Joffe, A. Z.: Alimentary toxic aleukia, *in 'Microbial Toxins'*, Ed. by Kadis, S. et al, Academic Press, New York, 139-189 (1971).
12. Vesonder, R.F., Ellis, J.J. and Rohwedder, W.K.: Elaboration of vomitoxin and zearalenone by *Fusarium* isolates and the biological activity of *Fusarium* produced toxins, *Appl. Environm. Microbiol.*, **42**, 1132-1134 (1981).
13. 이관영, 최인호, 이서래: 국내에서 분리된 *Aspergillus*에 의한 Aflatoxin의 생성. 한국생화학회지, **8**, 1-9 (1975).
14. Kim, J.C., Kang, H.J., Lee, D.H., Lee, Y.W. and Yoshizawa, T.: Natural occurrence of Fusarium mycotoxins (trichothecenes and zearalenone) in barley and corn in Korea. *Appl. Environm. Microbiol.*, **59**(11), 3879-3802 (1993a).
15. Kim, J.C., Park, A.R., Kang, H.J., Lee, Y.W., Yun H.J., and Cha, S.H.: Variation in trichothecene and zearalenone product by Fusarium graminearum isolates from corn and barley and corn in Korea. *Kor. J. Micorbiol.*, **31**, 579-587 (1993b).
16. 손동화, 박애란, 서병철, 김진철, 이인원, 남영중, 허우덕: Aflatoxin B_1의 검출을 위한 효소면역측정법 개발. *한국응용미생물학회지*, **20**(2), 225-232 (1992a).
17. 손동화, 박애란, 이인원: 수입 곡물중의 Aflatoxin B_1의 검출을 위한 효소면역측정법의 평가. 한국응용미생물학회지, **20**(3), 355-361 (1992b).
18. Chu, F.S., Hsia, M.T.S. and Sun, P.S.: Preparation and characterization of aflatoxin B_1-(O-carboxymethyl)oxime. *JAOAC*, **60**, 791-794 (1977).
19. Chu, F.S. and Ueno, I.: Production of antibody against aflatoxin B_1. *Appl. Environm. Microbiol.* **33**, 1125-1128 (1977).
20. Kawamura O., Nagayama, S., Sato, S., Ohtani, K., Ueno, I., and Ueno, Y.: A monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for aflatoxin B_1 in peanut products. *Mycotoxin Res.*, **4**, 75 (1988).
21. Ram, B.P., Hart, L.P., Shotwell, O.L., and Pestka, J.J.: Enzyme-linked immnusorbent assay of aflatoxin B_1 in naturally contaminated corn and cottonseed. *JAOAC*, **69**, 904 (1986).
22. Chu, F.S., Fan, T.S.L., Zhang, G.S., Zu, Y.C., Faust, S. and McMahon, P.L.: Improved enzyme-linked immunoassay for aflatoxin B_1 in agricultural commodities. *JAOAC*, **70**, 854 (1987).
23. El-Nakib, O., Pestka, J.J. and Chu, F.S.: Determination of aflatoxin B_1 in corn, wheat, and peanut butter by enzyme-linked immunosorbent assay and solid phase radioimmunoassay. *JAOAC*, **64**, 1077 (1981).
24. Ueno, I.: A simple and improved enzyme-linked immunosorbent assay method for microquantitation of aflatoxin B1 peanuts and blood plasma. *Proc. Jpn. Assoc. Mycotoxicol.*, **1986**, 24 (1986).
25. 김종규: Aflatoxin B_1에 대한 항체 생산 및 ELISA법을 이용한 쌀의 Aflatoxin B_1 오염에 관한 연구. 서울대학교 보건대학원 박사학위논문 (1991).
26. 손동화: 아플라톡신 고감도 신속 검출법 워크샵, *한국식품개발연구원* (1995).