식품 중 곰팡이독소 검출기법의 최신 동향

Mycotoxin Detection in Food: Recent Developments and Future Trends

옥현이 · 장현주 · 전향숙*

Hyun Ee Ok, Hyun-Joo Chang, Hyang Sook Chun*

한국식품연구원 식품위해평가연구팀

Food Hazard Assessment Team, Korea Food Research Institute

Ⅰ 서 론

곰팡이독소 분석기법은 곰팡이에서 생성된 화학물질과 동물에서 발생된 질병과의 연관성이 처음으로 규명된 이래로 꾸준히 발전되어왔다. 곰팡이독소 검출법은 새로운 분석 기술과 융화되어 빠르게 발전되고 있는데, 그 이유는 인류가 건강을 증진시키고자하는 끊임없는 욕구가 있고, 급성독성으로부터 가축을 보호함으로써 생기는 경제적 이익과 곰팡이독소에 만성적으로 노출되는 것을 감소시킴으로써 얻는 생산적 이익이 있을 뿐 아니라 식품과 사료의 최소허용량 설정을 위한 검사법이 필요하기 때문이다.

곰팡이독소의 검출은 곰팡이독소를 생산하는 곰팡이의 검출과 구분된다. 보통 곰팡이의 오염정도는 곰팡이가 성장하면서 식품에 나타나는 영향을 육안으로 또는 간접적으로 분석한다. 즉, 곰팡이의 성장은 식품의 물리적, 화학적 구성을 변형시키므로 식품 중 오염물질을 구별하는데 효과적으로 이용된다. 곰팡이 오염에 관한 초기 연구는 aflatoxin 오염지표 중 하나인 kojic acid 유도체의 bright greenish-yellow fluorescence (BGYF)를 검출하는 것이었는데, 이것은 옥수수 낟알 중의 BGYF를 검출하는데 이용되는 광섬유장치 (fiber optic device) 개발의 기초가 되었다. 최근에는 화상분석 (image analysis), machine vision system, 적외선 분광법 (infrared spectrophotometry) 등이 이용되고 있다. 이러한 기술의 장점은 곰팡이로 오염된 식품을 신속하게 분류하여 독소에 노출되는 위험을 감소시키는 것이다. 그럼에도 불구하고 곰팡이 오염정도와 곰팡이독소 함량은 정비례하지 않으므로 곰팡이독소 그 자체를 검출해야 할 것이다.

곰팡이독소의 검출에는 다양한 분석 환경 요인이 작용하는데, 분석 속도, 정확도, 분석 수행시 요구되는 기술수준, 비용 등을 고려하여 적합한 방법을 채택해야 한다. 또한 분석 방법 채택시 이동 실험실 또는 현장에서 최소한의 훈련으로 수행되는지, 실험실에서 숙련자들에 의해 수행되는지의 여부도 고려하여야 한다. 이 두 가지 경우에서 공통적으로 요구되는 것은 전체 시료를 대표할 수 있는 시료를 선정하는 것이다. 시료채취, 분쇄, 추출 등의 일련의 과정은 곰팡이독소 검출법과 비교했을 때 오히려 더 많은 주의와 시간이 소요되므로, 전체 분석 시간

*Corresponding author: Hyang Sook Chun
Korea Food Research Institute, San 46-1, Backhyun, Bundang, Sungnam, Kyonggi, 463-746, South Korea
Tel: +82-31-780-9273 / Fax: +82-31-709-9876
E-mail: hschun@kfri.re.kr

을 최소화하기 위해서 신속한 분석기술 뿐 아니라 시료 추출기술이 필요하다고 할 수 있다.

곰팡이독소 검출에 널리 이용되는 방법은 thin layer chromatography (TLC)법과 효소면역분석법 (ELISA)이다. TLC법은 곰팡이독소를 처음으로 화학물질로 정의하게 한 분석법으로서, 과거에 주로 사용하던 방법이었으나 최근 high-performance liquid chromatography (HPLC)법으로 많이 대체되었다. 그러나, 비용이 적게 들고 많은 시료를 동시에 분석할 수 있으며 화상분석 또는 densitometer로 정량화할 수 있는 장점을 지니므로 여전히 곰팡이독소의 viable screening technique으로 사용되고 있다. 한편, 효소면역분석법은 1970-80년대에 곰팡이독소에 대한 항체 생산이 가능하게 됨에 따라 사용되어 온 방법으로서, 주로 스크리닝할 때 이용되고 비교적 비용이 적게 들며 미국 분석화학자 협회 (AOAC)의 검증을 받은 ELISA test kit가 시판되어 이용되고 있다.

좀 더 세부적으로 살펴볼 때, 크로마토그래피법은 곰팡이독소 검출에 꾸준히 이용될 뿐 아니라 발전되고 있는 방법이다. 흔히 실험실에서 사용되는 크로마토그래피법은 HPLC법으로서 aflatoxin (AF), zearalenone (ZEN), ochratoxin(OC), fumonisin (F) 등은 형광검출기를, deoxynivalenol (DON)은 자외선검출기를 이용하며, T-2 toxin과 같은 trichothecene류는 gas chromatography법 (GC)으로 분석한다. 크로마토그래피법은 곰팡이독소에 대한 특이성과 선택성을 지니는 장점이 있는 분석법이다. 최근 질량분광검출기가 장착된 크로마토그래피가 이용되고 있는데, 측정대상물질을 확인할 수 있다는 장점은 있으나 비용이 많이 들고 상당한 수준의 기술을 요하는 분석법이다.

흔히 사용되는 또 다른 분석법은 곰팡이독소와 결합하는 항체의 특이성을 이용하는 면역분석법이다. 곰팡이독소는 대부분 저분자 (1,000 달톤 이하)이므로 이들을 검출하기 위해 사용되는 면역분석법의 형식은 다소 제한적이다. 곰팡이독소 검출에 사용되는 면역분석법은 대부분 경쟁적 분석법인데, 곰팡이독소에 특이적인 항체를 표면에 부착시켜 분석하는 직접분석법과 항체 대신 곰팡이독소 또는 곰팡이독소 – 단백질 결합체 (mycotoxin-protein conjugate)를 표면에 부착시켜 분석하는 간접분석법이 있다 (Fig. 1). 이 두 가지 방법 모두 곰팡이독소 자체를 직접 검출하는 것이 아니라 효소 반응 생성물을 측정하기 때문에 용어상 혼동의 소지가 있으므로, 표면에 부착되는 것이 항원인지 항체인지 구분하는 것이 필요하다. 이러한 면역분석법은 본 고에서 논의되는 바이오센서 분야에서 주로 기본적으로 응용되는 기술이다 (Fig. 2).

센서 (sensor)는 측정대상물로부터 정보를 감지 또는 측정하여 그 측정량을 인식 가능한 유용한 신호로 변화하는 장치 (device)로 정의되고, 특히 바이오센서 (biosensor)는 생물학적 요소와 분석 대상 물질과의 반응에서 나타나는 전기화학적 변화, 열에너지 변화, 형광 또는 색의 변화 등을 인식 가능한 신호로 변환시켜주는 장치와 결합하여 제작한 기구를 말한다. 바

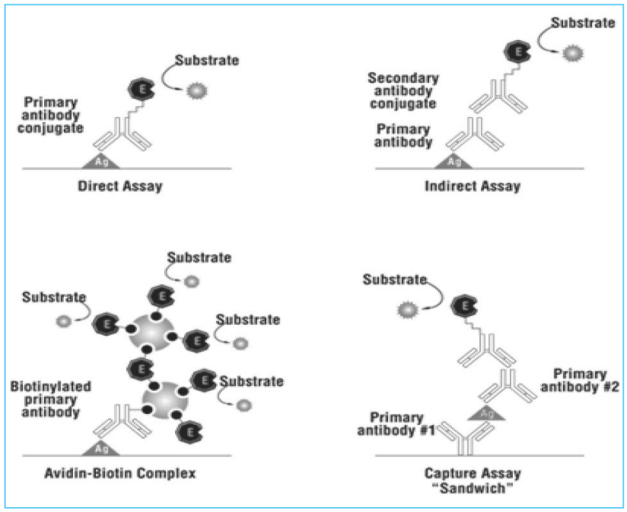

Fig. 1. Immunoassay formats.

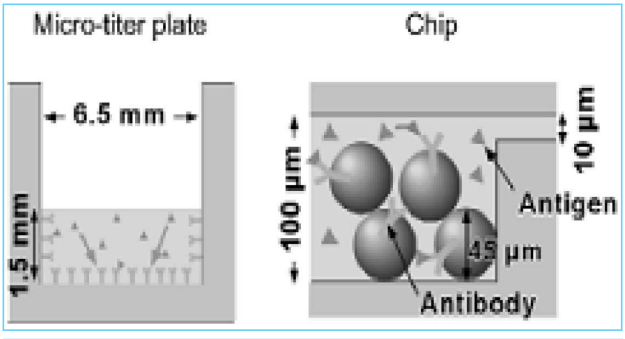

Fig. 2. Schematic illustration of the immunoassay in microtiter plate (bulk) and immunoassay (micro).

이오센서는 1962년에 포도당을 측정하는 최초의 센서가 개발된 이래로 생물공학, 화학공학, 컴퓨터공학 등 여러분야가 접목되어 급속도로 발전되어 왔고 식품 안전성 분야에서도 식품 위해물질의 검출에 사용되는 등 그 적용범위가 확대되고 있다.

그러므로, 본 고찰은 농산물을 포함하는 식품 중 곰팡이독소를 검출하는 최신기법 중 소산파 기술 (evanescent wave technologies)을 이용한 광섬유 장치 및 표면 플라즈몬 공명, lateral flow 및 dipstick devices, fluorescence polarization, microbead assays, capillary electrophoretic immunoassays를 중심으로 기술하고자 한다.

Ⅱ. 곰팡이독소 검출기법

A. 소산파 기술 (evanescent wave technologies)

1. Fiber Optic Devices (광섬유 장치)

빛을 광섬유와 같은 물질에 조사하면 적절한 조건하에서 빛이 내부에서 굴절되어 섬유를 통해 전파된다. 그러나 그 빛의 일부는 소산파 (evanescent wave)의 형태로 섬유에 남게 된다. 소산파 또는 소멸파는 빛이 유리 슬라이드와 같은 표면에서 반사될 때 생성될 수도 있는데, 그 특징은 섬유의 굴절률, 순환물질의 굴절률, 입사광에 의해 영향을 받는다는 점이다. 소산파의 강도는 섬유와 순환물질 사이의 접촉면으로부터 거리에 비례하여 점차 감소하는데, 이러한 효과를 이용하여 광섬유 장치를 제조할 때 결합 현상이 섬유 표면에서 발생하도록 할 수 있고, 표면 플라즈몬 공명의 경우 금속필름에서 플라즈몬 (전하 밀도파)을 유도할 수 있다.

섬유 표면의 결합 현상을 감지하기위한 여러 유형의 광섬유 장치가 있는데, 그 한 예가 앞에서 언급한 ELISA를 이용한 장치이다. ELISA는 항체나 항원 중 하나가 섬유 표면에 부착될 수 있다. F와 AF 면역센서를 예로 들면, 먼저 F의 경우 항체가 섬유 표면에 부착되고 곧이어 섬유는 형광물질과 결합된 fumonisin B_1 (FB_1-FL)과 혼합된 시료에 노출되는데 형광물질과 결합된 F와 그렇지 않은 F는 섬유 표면에 부착되기 위해 경쟁하게 된다. 결합되지 않은 물질을 제거하기 위해 세척한 후 결합된 형광발색단 (fluorophore) 양을 측정한다. 이것은 FB_1-FL의 형광이 소량 광섬유에 포착되어 민감한 검출기로 전달되었기 때문이며, 이 장치를 이용하여 옥수수에 있는 F를 중간 감도로 8분 내에 검출할 수 있었다. 이 실험에서 메탄올과 물로 추출한 옥수수 추출물을 시료로 이용하였는데, 메탄올 함량을 줄이기 위해 메탄올 추출물을 희석하였을 때 분석 감도가 낮아졌다. Immunoaffinity column을 사용하여 FB_1을 농축하면 분석 감도는 향상되었으나, 방법상 간편함이나 시간이 적게 소요되는 장점들이 없어졌다. 한편, AF 면역 센서의 경우, F와는 달리 AF 그 자체가 검출될 수 있을 정도의 천연 형광을 가지므로 AF와 항체가 결합되면 섬유 표면에 있는 형광발색단의 농도를 증가시켜 AF의 비경쟁적 분석을 효과적으로 수행할 수 있다 (F의 경쟁적 분석과 비교하여). 비경쟁적 분석법의 장점은 직접 곰팡이독소를 검출한다는 것인데, 이 광섬유장치는 2 ng aflatoxin B_1 (AFB_1)/mL의 검출한계를 지닌다.

이 밖에 소산파 원리를 이용하지 않고 AFB_1을 검출하는 형광면역 센서 (fluorescence-based immunosensor)가 보고되었는데, AFB_1-bovine serum albumin (BSA) 결합체 (conjugate)가 막에 코팅된 경쟁적 분석법이 제시되었다.

2. Surface Plasmon Resonance (SPR, 표면 플라즈몬 공명)

소산파 효과가 응용된 또 다른 예는 표면 플라즈몬 공명

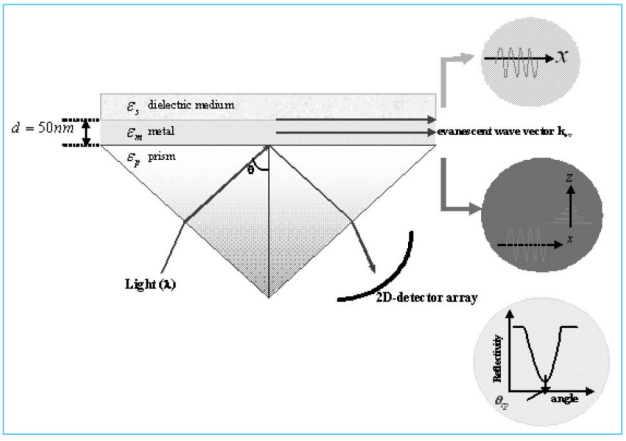

Fig. 3. Schematic of a Surface Plasmon Resonance (SPR) Biosensor.

(SPR)이며 그 원리는 다음과 같다. SPR은 단일파장의 편광된 빛이 굴절율이 다른 두 매질의 경계면에서 전반사 될 때, 계면에 있는 금속층 (gold foil) 전자들에 의해 특정각에서 빛에너지와 표면 플라즈몬의 결합 (coupling)인 공명현상이 생긴다 (Fig. 3). 이 공명현상은 계면근처의 유전상수에 의해 영향을 받으며, 유전상수는 금속층 (유전층)의 두께나 굴절율변화에 민감하게 반응하게 된다. 계면에 위치한 분자들이 검출물질과 상호작용을 하여 결합을 할 경우, 표면의 굴절율 변화가 생기고 이는 유전상수를 변화시켜 공명현상이 일어나는 각이 변하게 (shift) 된다. 따라서 처음에 공명현상이 일어나 빛의 흡수가 있었던 파장에서 모니터링을 할 경우 단백질과 같은 분자가 결합을 하면 공명현상이 일어나는 각 (공명각)이 변하게 되고, 일정 농도까지는 결합하면 할수록 처음 파장에서 빛의 강도가 비례하면서 증가하는 현상을 관찰할 수 있다. 그러므로 SPR 센서는 방사성 물질이나 형광물질을 이용한 별도의 표지를 하지 않고도 공명각의 변화 또는 반사광의 강도 변화를 감지하여 결합현상을 측정할 수 있다. 이러한 SPR 원리를 이용하면 다양한 생화학 물질들 사이의 결합이나 분리와 같은 생화학적 반응을 공명각의 변화로 감지할 수 있으므로 고감도 생화학 센서로 활용할 수 있게 된다. 이러한 원리를 이용한 장치가 1990년대 초 스웨덴의 Biacore AB사에서 개발한 BIAcore 시스템이며 1 ng/mm^{2}의 질량변화까지 검출할 수 있어 분자량으로는 180 Da의 저분자 수준에서 세포수준까지 농도로는 pM 수준까지 측정할 수 있다. 또한 grating이나 평판 waveguide를 이용하여 프리즘과 같은 접촉광학계의 도움 없이도 SPR 현상을 유도할 수 있어 이동식 간편 측정 장치를 새롭게 제작할 수 있다.

SPR 면역분석법은 ELISA 원리를 이용한 것으로서 곰팡이독소 또는 곰팡이독소 – 단백질 결합체가 칩 (chip) 표면에 부착되어 곰팡이독소 특이 항체에 대하여 경쟁하게 된다. 또 다른 방법은 곰팡이독소 특이 항체가 칩 표면에 부착되어 비경쟁적으로 분석될 수 있다. SPR 면역분석법을 통해 AFB_1, DON, ZEN, ochratoxin A (OCA), F 등이 분석되고 있다. 예를 들면, AFB_1은 용액에서 센서의 표면에 부착된 AFB_1-BSA와 용액 내 AFB_1간의 경쟁을 이용하여 SPR 면역분석법으로 검출되었다. AFB_1 표준물질을 센서에 넣기 전에 항AF 항체와 10분간 배양한 후 이 항체를 센서표면에 부착시키고 센서표면을 재생시키기 위해 1 M ethanolamine/20% (v/v) acetonitrile로 항체/항원 상호작용을 방해한다. 센서의 검출범위는 3-98 ng AFB_1/mL로 ELISA에서 사용된 같은 종류의 항체보다 더 민감하다고 할 수 있다.

한편, SPR 면역분석법은 항원/항체 상호작용을 측정하기 때문에 친화도가 높은 항체나 또는 antibody fragment 선정을 위해 이 기술을 이용할 수 있는데, 예를 들면, AFB_1-BSA에 결합하는 single-chain antibody fragment (scFv)를 선정하는데 사용되었다. ScFv는 경쟁적 SPR 분석법으로 측정하며, 검출한계는 AFB_1 또는 G_1의 경우 약 50 nM 정도이다. 또 항AF scFv를 곡류추출물내의 AFB_1 검출에 이용하였을 때, 검출범위는 phosphate-buffered saline에서는 3-195 ng AFB_1/mL이었고 곡류추출물에서는 0.75-48 ng AFB_1/mL이었다. 이와 같이 곡물추출물에서의 검출한계가 더 낮은 이유는 5% (v/v) 메탄올을 사용했기 때문이라고 사료되며 이와 같은 현상이 AFB_1의 ELISA 분석에서도 발생한다고 알려져 있다.

SPR 면역분석법으로 DON을 검출하기 위해 DON-biotin 결합체를 이용한 연구가 보고되었다. 정제된 밀 추출물을 센서에 주입시키기 전에 토끼 다클론 항체 (rabbit polyclonal antibody)와 결합시키고 이에 대한 2차 항체를 첨가함으로써 반응이 5배 증가하였으나 검출 농도 범위가 고농도로 상승하였다. 분석시간은 비교적 빨라서 시료 전처리 10분, 분석시간 5분이 소요된다. DON 회수율은 밀에 50-500 ng/g으로 spike하였을 경우 평균 104±15%였고 검출농도 범위는 130-10,000 ng DON/mL이었다. 이와 같은 SPR 분석법의 결과는 오염된 밀의 GC-MS 또는 HPLC-UV 분석 결과와 양의 상관성을 나타냈다.

또한, 센서 표면에 부착된 DON-casein 결합체를 이용하여 DON을 분석하는 SPR 면역분석법이 보고되었다. 이 경우, 항체 결합 단계 후 센서표면은 6 M guanidine chloride로 재생되고 센서는 활성도의 손실 없이 500회 이용이 가능하다. 이 방법은 acetonitrile/water로 추출된 밀 중의 DON을 검출하는데 이용되었으며, 시료 정제과정은 필요하지 않으나 DON 항체

에 대한 영향을 최소화하기 위해 용매 강도를 줄인 후 주입해야 하므로 희석단계가 필요하다. 검출범위는 2.5-30 ng DON/mL이고, 결과는 HPLC-MS-MS와 양의 상관성을 보였다.

SPR을 이용하여 4가지 곰팡이독소를 동시에 분석하는 기술이 최근에 보고되었다. 센서 표면은 연속적으로 연결된 4개의 flow cell로 구성되어 있다. 앞에서 언급한 SPR 분석과 마찬가지로 시료를 센서에 주입하기 전에 곰팡이독소 특이 항체와 혼합하였고, 센서 표면에 곰팡이독소-단백질 결합체를 고정시키는 대신 곰팡이독소 자체를 부착시켰다 (DON은 예외로 DON-BSA 결합체로 고정). 시료는 90% acetonitrile로 추출하였고 추출물은 solid phase extraction column으로 정제하였다. 그 후 여과액을 10배 희석하고 분석 전에 4가지 항체와 혼합하였다 (DON, ZEN, AFB_1, FB_1). 이 분석은 센서 재생시간을 포함하여 25분 이내에 실행할 수 있다.

지금까지 기술한 SPR 분석법과 다르게 비경쟁적 방법을 사용한 연구가 보고되었는데, 직접적으로 곰팡이독소를 검출하기 위해 antibody-modified surface를 이용하여 F를 분석하였다. F는 AF (312 달톤)와 같은 다른 곰팡이독소보다 비교적 분자량 (721 달톤)이 크기 때문에 이 방법이 가능하다. 즉, 다클론 항F 항체가 표면에 고정되었고, 이 때, F 검출한계는 50 ng FB_1/mL이며 10분 내로 분석이 가능하다. 이러한 항체 고정방법의 장점은 비경쟁적 반응이므로 직접 곰팡이독소의 존재와 비례한다는 것과 독소-단백질 결합체가 필요치 않다는 것이다.

B. Lateral flow devices 및 dipstick devices

이 장치는 곰팡이독소 검출을 위해 오래전부터 시도되어온 방법으로서, 가정용 임신진단키트와 유사하여 곰팡이독소를 직접 검출하는 속성 일회용 장치이다. 이 런 유형의 장치를 면역크로마토그래피 시험법 (immunochromatographic test)이라 한다. 곰팡이독소 분석용 키트 개발의 장애요인은 곰팡이독소의 분자량이 작다는 것인데 큰 분자량의 항원 검출과는 달리 경쟁적 분석법으로 수행된다. Membrane-based flow-through immunoassay를 이용한 일회용 장치는 우유 중 aflatoxin M_1 (AFM_1) 분석에 수 년 동안 상업적으로 이용되어져 왔다. 주입된 액상은 막을 통과하여 막의 반대편에 위치한 흡착패드에 수집되며 효소 기질 배양단계가 필요하다. 이러한 형태의 시험법을 enzyme-linked immunofiltration assay, ELIFA)라 하며, 밀에 존재하는 OC와 T-2 toxin 검출에 대한 flow-through membrane immunoassay가 보고되었다.

Lateral flow device는 흐름이 막을 거쳐 옆으로 흐른다는 점이 ELIFA와 다르고 시약의 표지여부 (독소 또는 항체) 및 표지형태 (enzymatic, labeled liposomes, colloidal gold)에 따라 다양한 유형으로 만들 수 있다. Lateral flow ELISA와 같이 효소표지를 사용하는 장치는 AF, OC, T-2 toxin, ZEN 분석용으로 시판되고 있다.

Lateral flow device와 유사한 dipstick assay는 옥수수를 주원료로 한 식품에서 FB_1 분석을 위해 시도되었는데 검출한계는 40-60 ng FB_1/g으로 보고되었다. 이 방법은, 먼저 항F 항체와 항horseradish peroxidase 항체가 부착된 두 가지의 test strip을 tracer와 시료추출물을 함유한 관에 방치한 다음, 세척 및 기질 첨가 과정을 거치면 두 가지 선이 나타난다. 항horseradish peroxidase선은 양성 대조군이고, F는 F 항체선에 색이 감소함으로써 검출된다. 분석시간은 약 1시간 정도 소요되며, 이러한 dipstick 방식은 밀에서 AFB_1, T-2 toxin, 3-acetyl-DON, roridin A, ZEN 등의 다중 곰팡이독소 검출에 사용되었다.

곰팡이독소 검출을 위한 lateral flow device는 상업적으로 같은 strip에 음성반응을 조절하는 기능을 첨부하는 것과 분석시간을 단축하는 것을 목표로 지속적으로 발전되고 있다. 또한, 효소 반응 단계를 줄이기 위해서 colloidal gold conjugate 또는 liposome의 이용가능성이 연구되고 있다. Lateral flow device를 이용한 AFB_1 검출시 AF-modified liposome을 이용하였고 그 절차는 다음과 같다. 즉, AF 특이 항체가 부착된 strip을 AFB_1에 노출시키고, 이어 표지된 liposome (형광발색제인 sulforhodamine B를 함유)을 첨가하여 항체와 경쟁적으로 결합되도록 유도하였다. 발색정도는 AFB_1 수준과 반비례하여 나타나며 분석시간은 12분 정도 소요된다. 검출한계는 20 ng AFB_1/mL이고 검정곡선의 중

간점은 약 2,000 ng/mL이다. 이 결과를 통해 lateral flow 분석에서 비효소적 표지를 이용할 경우 분석시간 단축이 가능하다는 것이 입증되었다.

Lateral flow 및 dipstick 분석법은 장치의 용이성 때문에 곰팡이독소 분석을 위해서 안정된 비효소적 표지를 개발하려는 연구가 계속 진행되고 있다.

C. Fluorescence Polarization and Time-Resolved Fluorescence (형광편광과 시분해 형광)

최근에 fluorescence polarization (FP) immunoassay (형광편광 면역분석법)가 AF, DON, F, ZEN을 포함한 많은 곰팡이독소 분석을 위해 시도되고 있다 (Fig. 4). 앞에서 언급된 다른 센서와 달리 형광편광 면역분석은 용액상에서 분석하며 항체나 항원을 표면에 부착할 필요가 없다. 형광편광 검출기는 용액에서 형광발색단의 회전율을 간접적으로 측정하는데, 회전율은 분자크기와 직접 관련이 있기 때문에 일정온도에서 분자가 클수록 속도는 느려진다. 형광편광 면역분석은 곰팡이독소-형광발색단 결합체 (tracer)를 이용하는데, tracer는 저분자이고 용액에서 빨리 회전하므로 형광발색단의 회전율을 늦추어 편광을 증가시키기 위해서 곰팡이독소에 대한 항체를 첨가하여 tracer와 결합시킨다. 그러므로 형광편광 면역분석법은 전통적인 ELISA법의 단점인 항원-항체 결합체와 비결합체의 분리 단계 없이 용액 내에서 바로 저분자 물질을 검출할 수 있다.

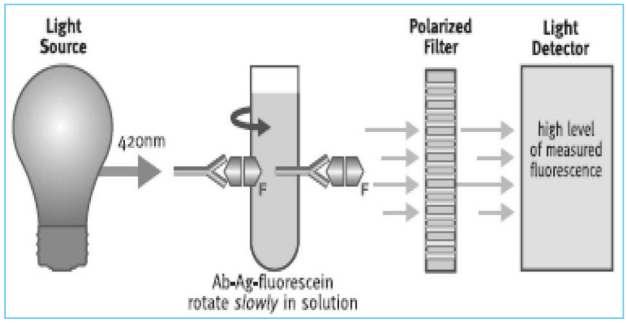

Fig. 4. Measurement of large complex using fluorescence, rotation and polarized light in Fluorescence Polarization Immunoassay (FPIA).

형광편광 면역분석법은 다른 면역분석법과 마찬가지로 적절한 항체와 tracer의 선정이 필수적이다. 이 분석법은 결합율 (kinetic assay)이나 평형혼합액의 종말점 (batch 또는 equilibration assay)을 이용하여 시행되는데 일반적으로 후자가 비숙련자에게 더 편리할 수 있다. 즉, 항체/tracer/곰팡이독소 결합체의 결합이 평형에 도달하는데 소요되는 시간이 형광편광 면역분석의 가장 중요한 요인인데, 평형에 도달하는 시간은 선택된 항체/tracer/곰팡이독소 결합체에 따라 1분에서 15분까지 다양하다. DON-fluorescein tracer를 이용하여 빠르고 민감하게 DON을 분석한 방법이 개발되었으나, 분석시 빨리 평형에 도달하지 못했고 비숙련자가 시료를 분석했을 경우에 문제점이 있었다. 그러나 다른 종류의 항체/tracer 결합을 이용하였을 때, 평형에 빨리 도달하였고 빠르고 (1분) 민감한 분석이 가능했다. 그러므로 적합한 항체/tracer를 이용하는 것이 빠른 형광편광 면역분석법 개발에서 중요하다. 형광편광 면역분석의 신속성은 필드에서 사용할 수 있는 상업용 장치 개발을 가능하게 하기 때문에 곰팡이독소 검출을 위한 장래성 있는 기술이라 할 수 있다.

형광편광 면역분석법과 달리 시분해 (time-resolved, TR) 형광면역분석법 (fluorescence immunoassay, FIA)은 fluorescence lifetime의 특성을 이용한다. 여기파장에서 빛이 주입된 후 형광감소율은 형광물질의 종류에 따라 다른데, 몇몇 형광발색단의 fluorescence lifetime, 즉 europium은 background fluorescence로 반응액 내에 존재하는 다른 형광물질보다 더 길다. 그러므로 europium은 대조군 없이 background fluorescence와 구별될 수 있다. 이러한 특성을 TR-FIA에 이용하여 최근에 bovine urine에서 zeranol과 α-zearalenol을 분석하였다. 분석원리는 기본적으로 경쟁적 ELISA를 이용하였고, 먼저 항IgG를 microtiter well에 코팅하고 이어 항zearalenol 항체, zeranol-ovalbumin-europium 결합체를 차례로 코팅하였다. 이 기술의 장점은 모든 시약이 well 표면에 흡착되므로 첨가/혼합 단계가 필요치 않고, 매우 민감한 방법이라는 것인데, 검출한계는 bovine urine에서 1.3 ng zeranol/mL 및 5.6 ng α-zearalenol/mL이었다.

D. Microbead Assays

Immunoaffinity column (IAC)은 오래전부터 곰팡이독소 분석용 시료의 정제에 이용되어 왔다. 가장 흔히 사용되는 유형은 곰팡이독소에 대한 항체가 구형의 bead표면에 코팅되어 컬럼에 채워지는 것이다. 희석된 시료 추출물을 컬럼에 주입하면 곰팡이독소는 컬럼에 부착되고 대부분의 간섭물질은 제거된다. 이어서 용매강도를 증가시켜 면역복합체를 유리시킴으로써 곰팡이독소를 용출시킨다. 이 때, 많은 경우 용출된 곰팡이독소는 유도체화되어 이동식 형광검출기로 검출되며, 용출된 독소를 한층 더 정제하여 기기분석에 이용할 수도 있다. Microbead assay는 하나의 기기로 정제 및 검출을 모두 수행하는 IAC assay의 축소판이다.

최근에 hand-held microbead sensor가 AF 분석을 위해 개발되었다. 이 장치는 액체를 소형의 튜브 연동식 펌프로 항AF 항체가 담긴 affinity column으로 옮기고, 시료가 컬럼을 통과하여 AF와 결합하도록 한 다음, 컬럼을 완충액으로 세척하고 메탄올/물로 유출시켜 형광검출기로 직접 AF를 검출한다. AF의 형광성은 C15-C16 이중결합의 존재여부에 따라 매우 민감하며, AFB_2가 AFB_1보다 더 형광성을 띤다. AF의 크로마토그래피 분석에서 C15-C16 이중결합을 이용하여 더 많은 형광성의 유도체를 생성하기 위해 bromine, iodine, trifluoroacetic acid와 반응시키기도 한다. 시판용 affinity column은 형광검출기로 분석하기 전에 형광을 강화시키는 유도 반응 용액을 사용한다. AF microbead sensor의 검출범위는 완충용액에서 0.1-50 ng/mL로 보고되었다. 기기는 약 500 mL의 시험액을 보유할 수 있으며 약 100회 분석이 가능하다. 그러나 항체를 이용한 affinity column의 재사용은 문제가 될 수 있는데, column의 부착물, 항체의 변성/재생, 항체의 침출과 같은 요인들이 항체를 이용한 affinity column의 재사용에 영향을 미친다.

항체가 아니라 항원이 부착된 affinity column은 경쟁적 분석법에 이용된다. 경쟁적 분석법의 단점은 곰팡이독소를 간접적으로 검출하는 것이나, 항체 코팅이 안정적이라면 재사용할 수 있는 장점이 있다. AFB_1을 검출하기 위해 microbead를 이용한 자동 IAC 시험법이 개발되었는데, 유형은 sequential injection immunoassay (SIIA)이다. 이 방법을 사용할 경우, 시료 전처리 및 정제는 1시간, 분석은 8분이 소요되었다. 또한 유사한 시험법이 ZEN 표준물질에 대해서 수행되었는데 검출한계가 5 ng/mL이었다. SIIA는 효소적 반응을 이용하여 수행될 수도 있는데, 이 때 기기는 소형 분광검출기가 이용된다. 초기 작업에 따라 bead는 AFB_1-BSA로 코팅되고 alkaline phosphatase로 표지된 2차 항체를 이용한다. 시료 추출/희석에 15분, 분석에 10분 가량 소요되고 AFB_1 표준물질의 검출한계는 0.2 ng/mL, 시료에서는 4 ng AFB_1/g이었다.

여러 종류의 FIIA (flow-injection immunoassay)에서 microbead 대신 antigen-tagged liposome을 이용한 방법이 flow-injection liposome immuno-analysis (FILIA)이다. 이 분석법은 옥수수에서 F 분석에 시도되어 왔으며, ELISA와 마찬가지로 형광 강도는 F 농도와 반비례한다. 분석시간은 11분이며, 검출한계는 FIIA 방법으로는 0.1 ng, HPLC-fluorescence 방법으로는 2.5 ng이었다.

E. Capillary Electrophoretic Immunoassays (모세관 전기영동 면역분석법)

Capillary electophoresis (CE)는 여러 곰팡이독소가 혼합되어 있거나 복잡한 식품 매트릭스로부터 전기장을 이용하여 곰팡이독소를 분리해내는 크로마토그래피 기법이다 (Fig. 5). 즉, 시료로부터 HPLC와 유사한 정제과정으로 곰팡이독소를 분리하고, 정제된 시료를 모세관에 주입한다. 그 후, 전기장에서 이들을 분리하고 분석물을 형광 또는 UV로 검출한다.

최근 CE를 이용한 곰팡이독소 검출법이 발전되어 multiphoton excitation을 이용한 β-cyclodextrin이 AF와 patulin을 검출하는데 사용되었다. AF의 경우 검출한계가 0.2-0.4 nM로 감도가 높았다. 그밖에 4종류의 AF, OCA와 B를 동시에 검출하는 방법이 보고되었다. 또, micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC)는 capillary zone electrophoresis의 변법으로 AF와 같은 중성화합물 검출에 더 유용하다. 검출한계는 AFB_2가 7.2 nM (2.3 ng/mL), AFG_1이 31 nM (10 ng/mL)로 보고되었다.

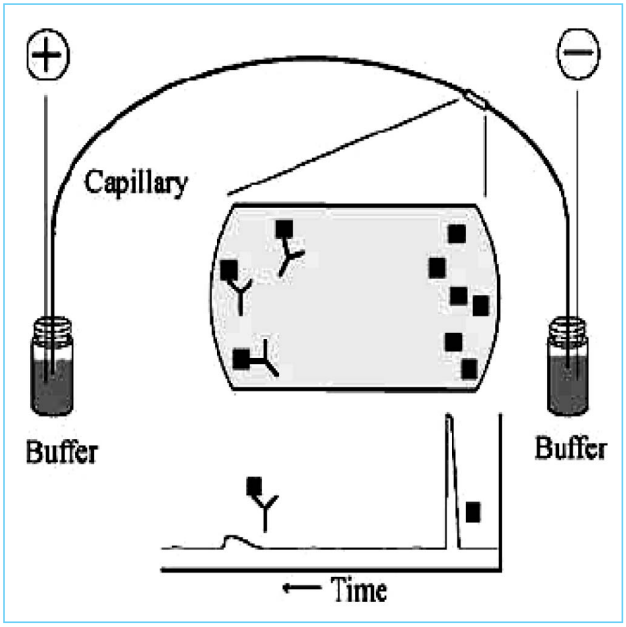

Fig. 5. Schematic of a Capillary Electrophoretic Immunoassay. In this format, antibody(Y) is combined with sample and a fluorescence-labeled mycotoxin (tracer: ■).

한편, 옥수수 중의 F는 immunoassay와 CE가 혼합된 형태로 분석되었다. 분석시간은 4분의 전기영동단계와 2분의 모세관 세척단계를 거치므로 비교적 빠르며, 감도는 사용된 항체의 농도에 따라 차이를 나타내었다. 적정 항체 농도에서 적정곡선의 중간점은 500-1,700 ng FB_1/mL 범위였는데, 이러한 수준의 감도는 고농도의 FB_1 (10,000 ng/g 이상)을 함유한 옥수수 시료에서만 분석이 가능하다. 이 때 검출 감도는 높은 전기장 세기하에서 F와 tracer에 대한 항체의 상대적 친화력에 매우 영향을 받는다.

다중동시검출법 개발을 위해 아직 발전이 미미한 기술로는 모세관을 이용하여 시약을 multichannel device로 운반하는 기술이다. 현재 미세 유체 공학이 발달되고센서 구성요소가 소형화되고 있는 추세이므로 향후 'sensor on-a-chip' 기술 또는 'array biosensor'를 이용한 multichannel mycotoxin sensors가 개발되어 실용화될 수 있을 것이다.

Ⅲ. 결 론

식품이라는 복잡한 매트릭스에 매우 낮은 수준으로 존재하는 곰팡이독소를 정량하기 위해서 민감하고 재현성 있는 검출기법이 꾸준히 발전되고 있다. 원칙적으로 검사된 시료는 전체 시료를 대표해야 하며 분석법은 민감하고 정확해야 한다. 현재 알려진 곰팡이독소 분석기술은 대체로 이러한 조건을 만족하나 신속성, 정확성, 다중성 측면에서 좀 더 개선이 요구되고 있는 실정이다. 또한, 앞으로 비교적 덜 알려졌거나 미발견 곰팡이독소의 검출에 대해서도 실험실에서 상시 분석할 수 있는 방법이 개발되어야 하며, 노동력과 비용을 줄일 수 있도록 더 효율적인 검출기술이 모색되어야 할 것이다.

같은 시료에서 여러 가지 곰팡이독소를 동시에 분석하는 기술 개발이 여러 연구자들에 의해서 수년전부터 진행 중이나 이들 곰팡이독소의 극성과 물리적 성질의 차이, 검출되는 농도범위가 다르므로 동시검출에 어려운 점이 있다. 이러한 점에서 질량분광법은 상당히 발전가능성을 지니고 있으며, array 방식을 이용한 항체기반 검색기법 (antibody-based screening assays)도 관심분야의 하나이다. 또한 분석기기가 점점 소형화되어 hand-held device 개발의 가능성이 제시되고 있으며, 미세 유체 공학과 capillary-based assay의 발전으로 가까운 미래에 'assay-on-a-chip' 기술이 개발될 수 있을 것이다.

바이오센서를 이용한 검출법에서 일반적으로 많이 이용되는 항원/항체 결합이 아닌 다른 결합을 이용하여 수행될 수도 있다. 예를 들어 flow injection assays는 이중 지질막을 기초로 우유 중 AFM_1 검출시 이용되었는데, 전기화학적 반응을 이용한 검출은 약 10초로 매우 빠르고, 나노몰 (nanomolar) 이하의 검출한계를 가진다. 또한, 항체를 기초로 한 기술 외에 비생물학적 결합이나 전이원소를 이용하는 방법이 있는데, 후자의 예는 molecularly imprinted polymers (MIPS)법으로서 OC, DON, ZEN 분석에 시도되었다.

앞으로는 곰팡이독소 그 자체를 검출하는 기술과 더불어 독소를 생성하는 곰팡이를 검출하는 기술도 함께 발전될 것으로 보인다. 즉, 색, 형광, 적외선, 시각 시스템 (vision system) 등으로 식품의 물리적 변화를 감지하는 방법이 곰팡이 검출에 사

용될 것이다. 곰팡이성장으로 인한 화학적 변화는 광학적 방법, GC-MS나 electronic nose와 같은 휘발성 성분의 변화를 측정하는 방법으로 검출될 수 있다. 또한, 독소생성 곰팡이의 DNA 검출은 다양한 polymerase chain reaction (PCR)-based methods, 예를 들어, random amplification of polymorphic DNA (RAPD), reverse transcription (RT)-PCR, competitive PCR, real-time quantitative PCR 등을 이용하여 측정할 수 있다.

지금까지 논의된 바이오센서를 기초로 한 곰팡이독소 검출 방법들은 종류에 따라 어떤 것은 아직까지 시험단계에 있고 또 어떤 것은 현장에서 이용될 수 있는 수준이다. 아직 개념 정립 단계에 머물러 있어 앞으로 식품에 적용될 수 있도록 타당성, 용이성 및 유효성을 입증해야 하는 많은 도전과제들이 있다. 센서를 포함한 여러 가지 분석기법을 이용한 곰팡이독소 검출기술은 유망한 분석기술로서 꾸준히 발전하고 있고 국내 식품과학도들에 의해 앞으로 보다 더 향상되리라 기대한다.

참고 문헌

1. Andreou, V., Nikolelis, D. (1998). Flow injection monitoring of aflatoxin M_1 in milk and milk preparations using filter-supported bilayer lipid membranes. Anal. Chem. **70:** 2366-2371.
2. Bacigalupo, M. A., Ius, A., Meroni, G., Dovis, M., Petruzzelli, E. (1994). Determination of aflatoxin B_1 in agricultural commodities by time-resolved fluoroimmunoassay and immunoenzymometric assay. *Analyst* **119:** 2813-2815.
3. Calson, M. A., Bargerson, C. B., Benson, R. C., Fraser, A. B., Phillips, T. E., Velky, J. T., Groopman, J. D., Strickland, P. T., Ko, H. W. (2000). An automated, handheld biosensor for aflatoxin. *Bio. Bioelect.* **14:** 841-848.
4. Carter, R. M., Jacobs, M. B., Lubrano, G. J., Guilbault, G. G. (1997). Rapid detection of aflatoxin B_1 with immunochemical optrodes. *Anal. Lett.* **30:** 1465-1482.
5. Maragos, C. M. (1997). Detection of the mycotoxin fumonisin B1 by a combination of immunofluorescence and capillary electrophoresis. *Food Agric. Immunol.* **9:** 147-157.
6. Maragos, C. M. (1998). Analysis of mycotoxins with capillary electrophoresis. *Sem. Food Anal.* **3:** 353-373.
7. Maragos, C. M., Thompson, V. S. (2002). Fiber-optic immunosensor for mycotoxins. *Nat. Toxins* **7:** 371-376.
8. McClure, W. F., Farsaie, A. (1980). Duel-wavelength fiber optic photometer measures fluorescence of aflatoxin contaminated pistachio nuts. *Trans. ASAE*, 204-207.
9. Mullett, W., Lai, E. P. C., Yeung, J. M. (1998). Immunoassay of fumonisins by a surface plasmon resonance biosensor. *Anal. Biochem.* **258:** 161-167.
10. Nasir, M. S., Jolly, M. E. (2003). Fluorescence polarization (FP) assays for the determination of grain mycotoxins (fumonisins, deoxynivalenol, vomitoxin and aflatoxins). *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **6:** 267-273.
11. Olsson, J., Böjesson, T., Lundstedt, T., Schnüer, J. (2002). Detection and quantification of ochratoixn A and deoxynivalenol in barley grains by GC-MS and electronic nose. *Int. J. Food Microbiol.* **72:** 203-214.
12. Pearson, T., Wicklow, D. T., Maghirang, E. B., Xie, F., Dowell, F. E. (2001). Detecting aflatoxin in single corn kernels by transmittance and reflectance spectroscopy. *Trans. ASAE* **44:** 1247-1254.
13. Siontorou, C. G., Nikolelis, D. P., Miernik, A., Krull, U. J. (1998). Rapid methods for detection of aflatoxin M1 based on electrochemical transduction by self-assembled metal-supported bilayer lipid membrances (s-BLMs) and on interferences with transduction of DNA hybridization. *Electochem. Acta* **43:** 3611-3617.
14. Sydenham, E. W., Shephard, G. S. (1997). Chromatographic and allied methods of analysis for selected mycotoxins. In: Gilbert, J., ed. *Progress in Food Contaminant Analysis.* New York: Chapman and Hall, pp. 65-146.
15. Trucksess, M. W. (2001). Rapid analysis (thin layer chromatographic and immunochemical methods) for mycotoxins in foods and feeds. In: de Koe, W. J., Samson, R. A., van Egmond, H. p., Gilbert, J., Sabino, M., eds. *Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Millenium.* 1st ed. Wageningen: Ponsen & Looyen, pp. 29-40.
16. van der Gaag, B., Spath, S., Dietrich, H., Stigter, E., Boonzaaijer, G., van Osenbruggen, T., Koopal, K. (2003). Biosensors and multiple mycotoxin analysis. *Food Control* **14:** 251-254.
17. Zölner, P., Jodlbauer, J., Lindner, W. (1999). Determination of zearalenone in grains by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry after solid-phase extraction with RP-18 columns or immunoaffinity columns. *J. Chromatogr. A* **858:** 167-174.