

ELISA법에 의한 zearalenone 생성균주의 검색

김성영 · 정선희 · 정덕화

경상대학교 식품공학과

초록 : ELISA법을 zearalenone 생성균주 검색에 응용하였다. 먼저 zearalenone에 대한 항체를 500배 희석한 후 microtiter well에 125 μl씩 주입하여 40°C에서 overnight시켜 coating하고, 시료용액과 enzyme을 37°C에서 30분간 반응시켰다. 배양후 washing buffer로 6회 세척한 다음 plate에 2,2'-azino-di-3-ethyl-benzthiazoline sulfonic acid(ABTS) 용액을 100 μl씩 첨가하여 15분간 발색시킨 다음 반응 정지액 100 μl씩을 가해 반응을 정지시키고 ELISA Reader로서 흡광도(410 nm)를 측정하였다. 그 결과 zearalenone 생성이 확인된 19 균주 중 분리균 R-5, C-46 및 S-134가 50 ng/ml 이상의 zearalenone을 생성하였다(1992년 11월 4일 접수, 1992년 12월 22일 수리).

Zearalenone을 비롯한 mycotoxin의 과거 분석방법은 thin layer chromatography(TLC),¹⁾ gas chromatography(GC)²⁾ 및 high performance liquid chromatography(HPLC)³⁾ 등에 의존하였는데, 이들 방법은 추출과 정제에 많은 시간과 유기용매가 소비되고 넓은 공간, 많은 기구, 그리고 전문인력을 필요로 하여 경제성이 없을 뿐만 아니라 처리과정에서 수반되는 안전성 문제로 실험의 한계성이 노출되었다. 이러한 문제점을 극복하기 위해서, 효소학적 기법이 mycotoxin 분야에 도입된 후 Thouvenot 등⁴⁾은 돼지로부터 zearalenone에 대한 항체를 생산하여 사람의 혈청을 radioimmuno assay 법으로 zearalenone의 함량을 보고한 바 있으나 방사성물질의 안전성과 폐기물의 문제점이 대두되었다. 최근 Liu 등⁵⁾은 *Fusarium* 속 곰팡이독소의 일종인 zearalenone을 검색하기 위해 토끼로 부터 항체를 생산하여 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)법을 개발하고, zearalenone의 측정에 이용함으로써 전통적인 분석법에서 유발되었던 문제점을 해소하게 되었다. 또한 Pestka 등⁶⁾도 돼지로부터 zearalenone에 대한 항체를 생산한 후 ELISA법을 확립하여 보고한 바 있으며 Roscoe 등⁷⁾에 의해서도 direct competitive ELISA법을 이용하여 옥수수에 오염된 zearalenone을 검색, 보고한 바 있다.

이러한 활발한 연구와는 달리 국내에서는 aflatoxin B₁에 대한 실험이외는 실질적인 실험결과가 거의 없고 특히, zearalenone에 대한 연구는 미흡한 상태로 이 분

야에 대한 기초적인 연구가 요청되고 있다. 본 연구자들은 전보⁸⁾에서 생산된 antibody를 이용하여 ELISA법을 확립한 다음 zearalenone 생성균주를 검색하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험 재료

실험균주로는 전보⁸⁾에서 영남지방의 곡류로부터 분리한 19균주를 ELISA법에 의한 zearalenone 생성여부 실험에 사용하였다.

또한 실험에 사용된 Tween 20, bovine serum albumin(BSA), 2,2'-azino-di-3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid(ABTS), horseradish peroxidase(HRP) 및 표준 zearalenone과 그 analogue는 Sigma사로부터 구입하였다. 그외 사용된 유기용매와 시약은 특급시약을 사용하였으며, ELISA법 확립을 위해 사용된 항체는 전보에서⁹⁾ 생산된 항체를 사용하였다.

배지 조성

실험에 사용할 곰팡이의 계대배양 및 보존을 위해 Table 1과 같은 potatoes dextrose agar(PDA) 배지를 사용하였고, zearalenone 생성을 위해 사용된 고체배지는 백미를 12시간 실온에서 증류수에 침지한 후 5 g씩을 시험관(18×200 mm)에 첨가하고 살균(121°C, 1 kg/cm²,

15 min)하여 사용하였다.

공시균의 배양

전보⁸⁾에서 zearalenone 생성균주로 여겨지는 균주를 전기한 바와 동일하게 고체배지에 접종하고 30°C에서 14일간 배양한 후 70% methanol 25 ml로 추출한 다음 추출액을 ELISA시료로 하여, 앞서 확립한 ELISA법으로 zearalenone의 생산성을 조사하였으며, 이에 앞서 또한 배양물을 70% methanol로 추출한 후 단계별로 희석한 다음 ELISA를 실시하여 배양물에 함유된 구성성분이 ELISA에 미치는 영향을 조사하였다.

Zearalenone의 측정

전보⁹⁾에서 얻은 항체를 활용하여 zearalenone 측정을 위한 ELISA 조건은 Fig. 1과 같다.

즉, 0.01 M PBS에 BSA를 1%되게 녹인 용액에 항체를 1:500으로 희석하여 microtiter well에 125 μl씩 주입한 다음 40°C에서 하룻밤 방치하여 coating한 후 washing buffer로 세척하였다. 표준 zearalenone과 zearalenone

Table 1. Composition of the PDA medium used for the subculture

Potatoes	200 g
Dextrose	20 g
Yeast extract	5 g
Agar	15 g
Distilled water	1 l

pH was adjusted to 5.6 at 25°C

- Wash coated plates ×3 by filling with PBS-Tween
 ↓
 Mix 200 μl sample solution and 200 μl Ze-HRP solution
 ↓
 Add 100 μl mixed solution
 ↓
 Incubate for 30 minutes at 37°C
 ↓
 Wash plate ×6 by filling with PBS-tween
 ↓
 Add 100 μl substrate
 ↓
 Incubate substrate for 15 minutes at 37°C
 ↓
 Add 100 μl stopping-reagent
 ↓
 Read at 410 nm

Fig. 1. Procedure of direct competitive ELISA for zearalenone.

oxime-HRP 최적 희석액을 같은 양으로 혼합한 후 100 μl씩 well에 주입하여 37°C에서 30분간 배양하였다. Washing buffer로 다시 6회 씻은 plate는 100 μl의 기질(2,2'-azino-di-3-ethylbenzthioazoline sulfonic acid) 용액을 첨가하여 결합된 zearalenone oxime-HRP를 발색시키고, 15분 후 반응정지액 100 μl씩을 가해 반응을 정지시켜 ELISA Reader(Dynatech, Lab. MR 600, U.S.A.)로서 흡광도(410 nm)를 측정하여 미리 작성한 표준곡선과 비교하여 zearalenone의 함량을 계산하였다.

결과 및 고찰

배지성분이 ELISA에 미치는 영향

전보⁸⁾의 HPLC법에 의해 zearalenone 생성균주로 선별된 19균주를 침지시킨 쌀의 고체배지에 접종한 후 30°C에서 14일간 배양시켜 분리균들의 zearalenone 생성능을 시험하기 앞서 배지성분 자체가 ELISA에 미치는 영향을 조사하였다.

그 결과 배지추출액은 Table 2에서 나타내고 있는 바와 같이 70% methanol로 5배 이상 희석할 경우 배지의 구성성분이 효소반응에 영향을 거의 미치지 않는 것으로 나타났다.

이러한 결과를 토대로 하여 배지추출물을 70% methanol로 5배 희석한 것과 표준 zearalenone을 70% methanol로 농도별로 희석하여 표준곡선을 작성하여 비교한 결과 Fig. 2에서 나타낸 바와 같이 배지의 구성성분이 ELISA에 거의 영향이 없어 비슷한 모양으로 나타났다. Roscoe 등⁷⁾도 direct competitive ELISA법에 의한 옥수수의 zearalenone 검색에서 70% methanol으로 옥수수를 추출한 용액과 70% methanol은 거의 같은 경향으로 ELISA 수행에 영향을 미치지 않았다고 보고하였다.

Ormond 등¹⁰⁾도 ELISA법에 의한 zearalenone과 유도 물질을 검색하기 위한 실험에서 돼지오줌을 40% methanol로 추출할 경우 추출용액이 ELISA 수행에 거의 영

Table 2. Effect of dilution time of rice medium extract by 70% MeOH on zearalenone determination by ELISA

Dilution ^{a)} times	O.D. (410 nm)		
	First	Second	Means
70% MeOH	1.219	1.242	1.231
5	1.242	1.249	1.230
20	1.233	1.275	1.254
50	1.282	1.272	1.257

^{a)}Dilution times of medium extract.

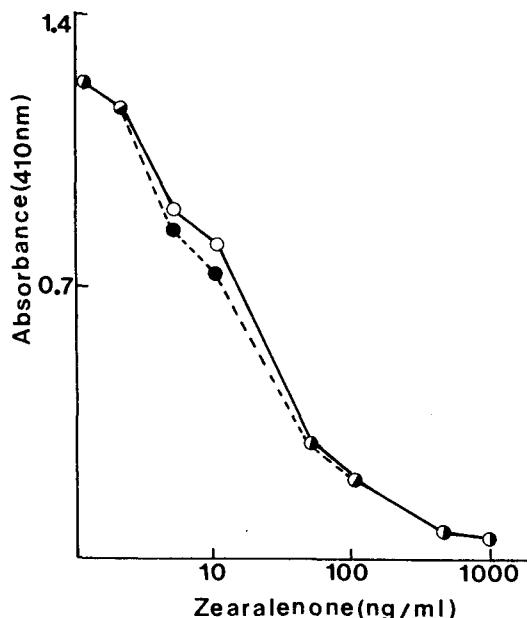


Fig. 2. Effect of rice medium extract on standard curve for zearalenone determination by ELISA. ●—●, Rice medium extract; ○—○, Extracted solvent

향을 미치지 않는다고 나타내었는데 이러한 결과들을 본 실험에서 사용된 70% methanol으로 쌀을 추출한 추출물과 거의 같은 유사한 경향을 보였다.

공시균의 zearalenone 생성능

이상의 결과를 토대로 배양된 배지를 70% methanol로 5배 희석하여 추출한 다음 ELISA법으로 공시균의 zearalenone 생성여부를 검색한 결과 HPLC법에서와 같이 19 균주 모두가 zearalenone 생성이 확인되었고, 그 중에서 50 ng/ml 이상의 zearalenone을 생성하는 3균주의 생성정도를 Table 3에 나타내었다.

이들의 zearalenone 함량은 쌀에서 분리한 R-5가 3,000 ng/ml로 가장 높은 함량을 보였으며 다음으로 토양에서 분리한 S-134가 260 ng/ml을 나타내었고, 옥수수에서 분리한 C-46이 60 ng/ml의 함량을 나타내었다.

이러한 결과를 미루어 보아 우리나라에도 zearalenone 생성균주는 물론 곡류를 비롯한 농산물에서의 zearalenone 오염 가능성을 배제할 수 없으며, 직접 농산물을 시료로 zearalenone 오염여부를 비롯한 체계적인 연구가 오염예방 차원에서 절실히 요구된다.

Table 3. Contents of zearalenone in cultured media of used strains by ELISA

Strains isolated	Isolation source	Zearalenone (ng/ml)
S-134	Soil	260
C-46	Corn	60
R-5	Rice	3,000

Roscoe 등⁷⁾도 오염된 옥수수로 부터 ELISA법을 이용하여 zearalenone을 검색한 결과, 3개의 시료에서 zearalenone의 함량이 127~2813 µg/kg으로 오염되어 있었다고 보고하였으며 Nagayama 등¹¹⁾은 ELISA법으로 노르웨이산 보리와 밀 그리고 폴란드산 곡류로 부터 분리한 균주 중 *F. sporotrichioides*, *F. poae*가 T-2 toxin을 생성한다고 보고한 바 있다.

무엇보다 본 실험에서 생산된 항체와 ELISA법을 활용하면 zearalenone의 신속한 정량과 zearalenone 생성균주의 초기 선별에 편리하게 이용될 수 있으리라 예측된다.

참 고 문 헌

1. Kamimura, H., Nishijima, M. and Naoi, Y.: J.A.O.A.C., 64 : 1067(1981)
2. Blaney, B. J. and Dodman, L.: J. Agric. Res., 39 : 21 (1988)
3. Ware, G. M. and Thorpe, C. W.: J.A.O.A.C., 61 : 1058(1978)
4. Thouvenot, D. and Morfin, R. F.: Applied and Environmental Microbiology, 45 : 16(1983)
5. Liu, M. T., Ram, B. P. and Pestka, J. J.: Applied and Environmental Microbiology, 50 : 332(1985)
6. Pestka, J. J., Liu, M. T., Knudson, B. K. and Hogberg, M. G.: J. Food Protec., 48 : 953(1985)
7. Roscoe, W., Ram, B. P., Hart, L. P. and Pestka, J. J.: J. Agric. Food Chem., 34 : 714(1981)
8. 김성영, 정선희, 정덕화: 한국식품과학회지, 24 : 581 (1992)
9. 하정기, 정덕화, 김성영: 한국식품위생학회지, 6 : 111 (1991)
10. Ormond, A. M., Andrew, J. T. and Peskta, J. J.: J.A.O.A.C., 73 : 65(1990)
11. Nagayama, S., Kawamura, O. and Ueno, Y.: Appl. Environ. Microbiol., 54 : 1302(1988)

Screening of zearalenone-producing strains by ELISA method

Sung-Young Kim, Sun-Hee Chung and Duck-Hwa Chung (Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea)

Abstract : ELISA method was applied for the screening of zearalenone producing strains. The developed ELISA was as follow: 125 μ l of diluted solution (1 : 500) of antibody was added to each microtiter well and incubated overnight at 40°C. For direct competitive ELISA, samples and zearalenone-peroxidase conjugate were mixed in a 1 : 1 ratio, and a 100 μ l of aliquot was then added to antisera-coated wells. Plates were incubated for 30 minutes at 37°C, and wells washed 6 times, and 100 μ l of ABTS substrates was added. Plates were incubated for another 15 minutes at 37°C, and 100 μ l of stopping reagent was added to the wells and absorbance was recorded at 410 nm on ELISA Reader. Among 19 strains showed zearalenone-producing ability by ELISA, 3 strains (R-5, C-46, S-134) produced more than 50 ng/ml of zearalenone.