11-15430
00-00247
8-01

고부가가치식품기술개발사업 R&D Report

Immuno-PCR을 이용한 곰팡이 독소 정량분석키트 개발 및 사업화 최종보고서 2019

농림축산식품부

발 간 등 록 번 호

11-1543000-002478-01

Immuno-PCR을 이용한 곰팡이 독소 정량분석키트 개발 및 사업화 최종보고서

2019. 1. 28.

주관연구기관 / ㈜메덱스
협동연구기관 / 서울대학교
협동연구기관 / 한국소비자원

농 림 축 산 식 품 부

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 "Immuno-PCR을 이용한 곰팡이 독소 정량분석키트 개발 및 사업화" (개발기간 : 2015 .10.23 ~ 2018.10.22.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 01. 28.

주관연구기관명 : ㈜메덱스 (대표자) 김 경 동 (인)
협동연구기관명 : 서울대학교 산학협력단 (대표자) 김 성 철 (인)
협동연구기관명 : 한국소비자원 (대표자) 이 희 수 (인)

주관연구책임자 : 박홍제
협동연구책임자 : 박용호
협동기관책임자 : 홍준배

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

<table>
<tr><td>과제고유번호</td><td>115004-3</td><td>해 당 단 계
연 구 기 간</td><td>3년</td><td>단 계 구 분</td><td>(1단계)/
(1단계)</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 사 업 명</td><td>단 위 사 업</td><td colspan="4">농식품기술개발사업</td></tr>
<tr><td>사 업 명</td><td colspan="4">고부가가치식품기술개발사업</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 과 제 명</td><td>대 과 제 명</td><td colspan="4">(해당 없음)</td></tr>
<tr><td>세부 과제명</td><td colspan="4">Immuno-PCR을 이용한 곰팡이 독소 정량분석 키트 개발 및 사업화</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 책 임 자</td><td rowspan="2">박홍제</td><td>해당단계
참여연구원
수</td><td>총: 81명
내부: 81명
외부: 명</td><td>해당단계
연구개발비</td><td>정부:
840,000천원
민간:
300,000천원
계:380,000
천원</td></tr>
<tr><td>총 연구기간
참여연구원
수</td><td>총: 81명
내부: 81명
외부: 명</td><td>총 연구개발비</td><td>정부:
840,000천원
민간:
300,000천원
계:1,140,000
천원</td></tr>
<tr><td>연구기관명 및
소 속 부 서 명</td><td colspan="3">㈜메덱스</td><td colspan="2">참여기업명</td></tr>
<tr><td>국제공동연구</td><td colspan="3">상대국명:</td><td colspan="2">상대국 연구기관명:</td></tr>
<tr><td>위 탁 연 구</td><td colspan="3">연구기관명:</td><td colspan="2">연구책임자:</td></tr>
</table>

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 갈음

연구개발성과의	

보안등급 및 사유	

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설·장비	기술요약 정보	소프트웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명정보	생물자원	정보	실물
등록·기탁번호											

국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)	보고서 면수

요 약 문

연구의 목적 및 내용	1. 연구 목적 위생적인 농산물 생산 및 관리체계 구축을 위해 오염된 농산물내 존재하는 곰팡이 독소를 효과적으로 모니터링 및 진단할 수 있는 과학적인 곰팡이 독소 정량 및 진단 키트를 개발하고자 함. 2. 연구 내용 Immuno-PCR법을 이용한 Mycotoxin 정량분석법을 개발하며, 이에 따른 Mycotoxin 정량분석 kit의 상품화 - Immuno-quantitative real-time PCR을 이용한 Mycotoxin 정량분석법 개발(Aflatoxin B_1, Deoxynivalenol, Ochratoxin A, Aflatoxin M_1, T-2 mycotoxin, Zearalenone) - 식품의 매트릭스에 따른 최적화 전처리 시험방법 개발 - Mycotoxin 진단 키트의 유효성 평가 - Mycotoxin 정량분석 kit의 상품화
연구개발성과	1. Immuno-PCR법을 이용한 Mycotoxins 정량분석법 개발 2. Mycotoxins 오염수준 확인 3. 6종의 마이코톡신에 대한 단클론 항체 생산 공정 확립 4. 6종의 Mycotoxins(Aflatoxin B_1, Deoxynivalenol, Ochratoxin A, Aflatoxin M_1, T-2, Zearalenone) 정량 키트 제품화 5. Mycotoxins 진단키트 유효성 평가
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	1. 성과 활용계획 ◦ Mycotoxins의 오염도 추정에 따른 합리적인 정부의 정책 및 관리 방안 마련이 가능 - Farm to Table까지의 농산물에 대한 mycotoxins 오염현황 파악 . 농산물의 유통단계별 오염도 및 노출량 파악 . 시중에 유통 중인 농산물에서의 오염도 확인 . 농산물에 올바른 조리 방법에 대한 Guideline 제시 ◦ 식품안전성 평가에서 과학적 접근 방식 도입 유도 - HACCP과 더불어 식품안전성 평가에 보다 과학적으로 접근 ◦ 농산물 중 mycotoxins 정량 기준 설정에 기초자료를 제공 ◦ 농산물 생산, 보관 및 유통 단계에서의 mycotoxins 관리 지침 제시 ◦ 농산물의 mycotoxins 정량기준 설정 및 식품의 보존 유효기간 제시 ◦ Mycotoxins에 대한 위해성 평가에 활용 2. 기대효과 1) 기술적 측면 ◦ Mycotoxins의 특이항원 확보 및 항체 생산기술 확보 - 각각 mycotoxins에 대한 단클론 항체의 대량 생산 기술 확보와 생산된 항체의 특이성 검증기술을 습득 ◦ Immuno-PCR법을 이용한 많은 연구는 되고 있지만 mycotoxins에 대한 정량방법은 아직까지 상품화를 시키지 못한 상황이지만 본 개발을 통해 산업화를 할 수 있는 기술을 확보함. - ELISA 방법과 real time PCR을 이용한 개발기술을 확보하며, 고정화 항체 및 항체 접합체의 안정화 기술을 습득 등을 통해서 실전적 경험 축적과 전문인력 양성 및 시스템 구축

	2) 경제·산업적 측면 ○ 생산부터 소비자까지의 각 단계별 mycotoxins 오염 정도를 파악할 수 있으므로 안전한 농산물 생산으로 소비자의 신뢰가 높아가 국내산 농산물의 소비촉진 및 국내 농산물 생산농가의 수입이 증가 예상 ○ 생산, 유통 등 산업체의 각각의 단계에서 과학적인 Critical point를 제시함으로써 경제적인 측면뿐만 아니라 효율적인 관리를 구현				
국문핵심어 (5개 이내)	곰팡이 독소	곰팡이독소생성 곰팡이	면역 PCR	실시간 PCR	농산물

SUMMARY

I. Purpose of the research project

- Development of quantitative Immuno-PCR kits for detection of mycotoxins to produce safe agricultural food products by monitoring and controlling mycotoxin contamination

II. Contents of the research project

- Development of mycotoxin (Aflatoxin B_1, Deoxynivalenol, Ochratoxin A, Aflatoxin M_1, T-2 mycotoxin, Zearalenone) quantitative assays using immuno-quantitative real-time PCR
- Evaluation of diagnostic accuracy of commercial immuno-PCR kits
- Development of optimal pre-treatment method of food matrix for application to immuno-PCR kits
- Commercialization of quantitative immuno-PCR kits

III. Achievements

- Establishment of quantitative mycotoxin detection protocol using immuno-PCR
- Evaluation of prevalence of mycotoxins in agricultural food products
- Establishment of monoclonal antibody production protocols for 6 mycotoxins (Aflatoxin B_1, Deoxynivalenol, Ochratoxin A, Aflatoxin M_1, T-2, Zearalenone)
- Commercialization of quantitative immuno-PCR mycotoxin diagnostic kits for 6 mycotoxins (Aflatoxin B_1, Deoxynivalenol, Ochratoxin A, Aflatoxin M_1, T-2, Zearalenone)
- Accomplishment of evaluation of diagnostic accuracy of the developed immuno-PCR kits

IV. Application and Contribution

1. Application

- Generation of the basic data for development of optimal policy to control mycotoxin contamination in agricultural food products
- Investigation of mycotoxin contamination in food producing processes
- Generation of supplemental data for bio-hazard analysis of food products with HACCP

- Providing the basic data for establishment of food-safety guideline
- Application to evaluation of food hazard analysis as measuring tools

2. Contribution

- Acquisition of monoclonal antibody generation skills for mycotoxins
- Acquisition of immuno-PCR technique for development of commercial mycotoxin diagnostic kits
- Providing an advanced technique to screen mycotoxin contamination in food producing processes from farm to market
- Suggestion of an effective mycotoxin control policy based on accurate investigation data using immuno-PCR kits

Contents

Chapter 1. Introduction ····· 9

Section 1. Purpose of the project ····· 9

Section 2. Background of the project ····· 9

Chapter 2. Contents and Results ····· 20

Section 1. Development of quantitative Immuno-PCR assay for Mycotoxin detection ····· 20

Section 2. Development of quantitative Mycotoxin detection kits ····· 44

Section 3. Evaluation of diagnostic accuracy of the Immuno-PCR kits ····· 89

Chapter 3. Accomplishment and Contribution ····· 165

Section 1. Critical points for the project accomplishment ····· 165

Section 2. Contributions to the related research field ····· 166

Chapter 4. Future Application Plans ····· 167

Section 1. Application plan of the project results in the future ····· 167

References ····· 168

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 ····· 9
제 1 절 연구개발의 목적 ····· 9
제 2 절 연구개발의 필요성 ····· 9

제 2 장 연구 수행 내용 및 결과 ····· 20
제 1 절 Immuno-PCR을 이용한 Mycotoxin 정량분석법 개발 ····· 20
제 2 절. Mycotoxin 정량분석 kit의 개발 ····· 44
제 3 절. Mycotoxin 진단 키트의 유효성 평가 ····· 89

제 3 장 목표달성도 및 관련 분야 기여도 ····· 165
제 1 절 평가의 착안점 및 기준 ····· 165
제 2 절 관련분야의 기술발전에의 기여도 ····· 165

제 4 장 연구개발결과의 활용계획 ····· 167
제 1 절 활용계획 ····· 167

붙임. 참고문헌 ····· 168

< 별첨 > 주관연구기관의 자체 평가서

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발 목적

○ 곰팡이독소에 대한 과학적인 정량법 및 진단 키트를 개발하고 농산물에서의 곰팡이독소 모니터링을 수행하여 과학적이고 위생적인 농산물 생산에 기여하는 미생물 관리 방안 체계를 구축하고자 한다.

제 2 절 연구개발의 필요성

○ 곰팡이독소(mycotoxins)는 곰팡이가 생산하는 2차 대사산물로서 사람과 가축에 질병이나 이상 생리작용을 유발하는 물질이다. 곡류, 견과류와 곰팡이가 번식하기 쉬운 식품에서 주로 발생하며, 이는 온도, 습도, 수확 전, 수확 기, 수확 후의 강우량의 정도와 같은 환경적 요인에 의해 영향을 받는다. 자연계에는 수만 종의 곰팡이가 존재하지만 지금까지 알려진 곰팡이독소는 300여종이다.

○ 식품에서 곰팡이독소 오염은 완전히 피할 수가 없으므로, 농산물과 그들 생산품에 대한 검사가 필수적이며, 많은 나라들은 곰팡이독소 오염을 최소화하기 위해 허용기준을 정하고 있다.

○ 현재 이러한 곰팡이독소를 확인 및 동정하기 위해서는 Liquid chromatography(LG)나 Gas chromatography(GC), LC-MS(LC Mass spectroscopy)를 이용하여 분석 가능하나 높은 가격의 기기와 담당 전문가만이 기기를 다룰 수 있으며, 기기 유지비용이 높고, 시간 및 노동력이 많이 필요로 하는 것이 단점이라 할 수 있다.

○ 보다 간편한 곰팡이독소 진단 키트를 이용할 수 있으나 모두 외국산제품으로 가격이 높고, 단일 mycotoxin만 검출 가능, 즉 다중분석은 어렵고 민감도가 낮은 문제점을 가지고 있다.

○ 이에 곰팡이독소에 대한 여러 mycotoxins을 분석할 수 있으며, 외국산보다 저렴한 국산제품, 높은 민감도와 특이성을 지닌 국산 진단키트의 개발이 절실하다 할 수 있다. 본 연구에서는 곰팡이독소에 대한 과학적인 정량법 및 진단 키트를 개발하여 보다 과학적이고 위생적인 농산물 생산에 기여하는 위해 미생물 관리 방안 체계를 구축하고자 한다.

1. 기술적 측면

가. 곰팡이독소 현황

○ 곰팡이독소는 크게 생성균에 따라 *Aspergillus*속, *Penicillium*속, *Fusarium*속 곰팡이독소 등으로 구분할 수 있다. *Aspergillus*속 곰팡이독소는 아플라톡신(aflatoxin), 오크라톡신(ochratoxin), 그리고 스테리그마토시스틴(sterigmatocystin) 등을 들 수 있다. *Penicillium*속은 파튤린(patulin), 시트리닌(citrinin)으로 대표되며 파튤린의 경우 그람(Gram) 양성균과 음성균에 대한 항생물질로 사용되어 왔으나 연구결과 포유류나 어류 등

에 급성독성을 나타내는 것으로 확인되었다.

- 그 외 *Penicillium*속 곰팡이독소로는 이슬란디톡신(islanditoxin), 루테오스키린(luteoskyrin), 그리고 루브라톡신(rubratoxin) 등이 있다. *Fusarium*속은 푸모니신(fumonisins), T-2 독소(T-2 toxin), 데옥시니발레놀(Deoxynivalenol, DON) 및 제랄레논(zearalenone) 등이 중요한 독소들이다.
- *Fusarium, Trichoderma, Stachybotrys*속 곰팡이가 생성하는 독소 중 4개의 환형구조를 가진 물질을 트리코테신(trichothecene)이라 하는데, 자연계에서 약 148종이 밝혀져 있으며 이 중 식품이나 사료에 존재하는 물질은 데옥시니발레놀, 니발레놀(nivalenol), 디아세톡시실페놀(diacetoxyscirpenol, DAS) 등 4종이다(송혁환, 2006).
- 국내·외의 연구동향을 살펴보면, 전 세계적으로 모든 곰팡이독소를 대상으로 활발히 연구가 진행되고 있으며, *Fusarium* 속 곰팡이독소에 대한 연구 비중이 가장 높고, 곰팡이독소별로는 아플라톡신에 대한 연구가 가장 활발히 이루어지고 있다. 그 뒤로 오크라톡신 A, 제랄레논, 푸모니신 등의 비중이 높고, *Penicillium*속 곰팡이독소인 파튤린과 시트리닌의 경우 1990년대 이 후 연구가 활기를 띄고 있다.

나. 검출방법

- 곰팡이 독소 분석법으로는 Thin layer chromatography(TLC), Gas chromatography(GC), High Performance Liquid Chromatography(HPLC), Mass Spectroscophy(LC/MS/MS)등의 기기 분석을 통하여 확인되는 분석법이 있으며, ELISA(The Enzyme Linked Immunosorbent Assay)를 이용한 진단키트가 시중에서 판매되고 있다.

표 1. Mycotoxin 검출 분석 방법

분석법	곰팡이독소	정제	유도체화	검출기	비고
LC,GC	아플라톡신	IAC	PCD	LC/FLD	AOAC 999.07
		CC	TFA	LC/FLD	식품공전
	파튤린	분배	"	LC/UVD	AOAC 2000.02
		분배	"	LC/UVD	식품공전
	오크라톡신	분배+ CC	"	LC/FLD	AOAC 991.44
		IAC	"	LC/FLD	Eskola,2002
	DON	Quick-Sep	4-DMAP	GC/ECD	AOAC 986.18
	푸모니신	SPE	OPA	LC/FLD	AOAC 995.15
	제랄레논	분배	"	LC/FLD	AOAC 985.18
HPTLC	아플라톡신	CC	"	densitometer	AOAC 993.17
ELISA	아플라톡신	"	"	ELISA KIT	AOAC 993.16
	제랄레논	"	"	ELISA KIT	AOAC 994.01
LC/MS	푸모니신	"	"	LC/MS/MS	
	오크라톡신	"	"	LC/MS/MS	

2. 경제 산업적 측면

○ 식품에 오염된 곰팡이독소에 관한 경제측면의 자료는 없으나, Journal of Agricultural and Food Chemistry(2013)의 내용을 인용하면, 한 가지 곰팡이독소(푸모니신)로 오염된 옥수수 주정박(DDGS, 20% 급여 시)이 육성·비육돈 사료에 함유되어 있다면 미국의 양돈 산업에 매 년 $147,000,000의 손실이 나타날 것이다. **알려진 곰팡이독소 500가지에 의해, 그리고 알려지지 않은 수많은 곰팡이독소에 의한 손실은 조 단위가 될 것으로 추측하고 있다(한돈 저널 2014)**

○ 곰팡이독소는 여러 가지 사료에서 흔히 발생하며 일상적으로 동물에 급여되고 있는 실정이다. **세계적으로 연간 약 25%의 작물이 곰팡이독소에 영향을 받는데 이는 수십억 달러에 해당**되며, **미국 및 캐나다의 농업경제에 곰팡이독소가 미치는 연간 경제적 손실은 평균 50억 달러(한국 5조 5천억여원)로 추정된다고 보고된 바** 있다. 경제적 손실은 가축의 생산성 저하, 작물의 손실, 그리고 곰팡이독소에 대한 규제 프로그램에 드는 비용 등도 포함하여 계산한 것이다(농림축산검역본부 자료, 생산성에 대한 곰팡이독소의 영향, 2012 및 미국 식품병리협회의 자료(http://www.apsnet.org/edcenter /intropp/topics/Mycotoxins/Pages/EconomicImpact.aspx))

○ 곰팡이 독소 중 Aflatoxin 검사하는 데에만 330억에서 550억정도의 예산이 소요되고 있는 실정이며, 매년 mycotoxin으로 인한 손실 세액과 검사 및 모니터링하는 데에 5,500억에서 1조 1,000억여원의 경제적 손실이 발생하는 것으로 나타나고 있다. (미국 APS, 2013)

3. 사회 문화적 측면

가. 식품 등의 오염 사고 현황

○ 아플라톡신 - 아플라톡신 오염 한약재

- 살구씨·파두 등 시중 한약재 4종 발암성 곰팡이 독소 (서울신문, 2008.4.9)
- **한약재 일부서 발암물질 검출 (경향신문, 2008.4.9)**
- **식약청조사 700점 중 18점서 '아플라톡신' 나와 (한겨레, 2008.4.9), 시중에서 유통되고 있는 한약재에서 발암성 곰팡이 독소가 검출**됐다. 또 조사대상 약재의 4.9%는 당 10만개 이상의 곰팡이에 오염된 것으로 나타났다.

○케냐, 급성 아플라톡신증, 317명 환자 중 125명 사망, 곰팡이독소 오염 옥수수 (2004)

○ 미국 오트밀 제품 중 일부에 **'오크라톡신 A'(OTA)**라는 진균류 관련 독소가 함유돼 있다는 한 구결과가 발표됨에 따라 귀리와 시리얼과 같은 제품의 곰팡이 독소를 면밀히 살펴볼 필요가 있다고 보도하였다(농업 및 식품화학 저널, 2015). **미국 시중 판매되는 옥수수, 쌀, 밀 및 귀리를 성분으로 한 시리얼 샘플 500개를 2년 동안 구매, 분석한 결과 귀리 성분 시리얼 검체 중 8%에서 OTA 수치가 유럽 안전 기준 초과**한 것으로 나타났다.

○ **기후 변화 인해 온대 기후에 속한 유럽 일부 국가 및 미국 등에서 곰팡이독소의 발생이 증가될 것이라는 예측**이 나오고 있다(Paterson and Lima, 2010). 즉, 현재온대지역의 기후는 아플라톡신 생산의 최적 기온과 유사한 아열대기후로 바뀌어 아플라톡신에 민감한 것으로 알려진 농작물들(옥수수, 땅콩 등)의 오염 가능성은 더욱 커진다고 한다.

○ **우리나라 국립기상연구소(2011)**에서도 복사강제력의 정도에 따라 예측한 국제 표준 기후변화 시나리오인 RCP(Representative Concentration Pathway)에 근거하여 2100년까지 전망한 결과를 공표하였다. 이에 의하면 **21세기말 RCP 8.5 시나리오 하에서는 대관령을**

중심으로 인제, 홍천, 원주, 제천 등을 제외한 전 지역이 아열대 기후지역에 포함될 것으로 전망하였다.

○ 따라서 현재는 아플라톡신이 국내 농작물이나 관련식품에 특별한 문제를 일으키지 않는 상황이더라도, 앞으로 **이들 독소가 심각한 위해 요소로 작용할 수 있다. 뿐만 아니라 현재 우리나라의 경우 수입식품이 차지하는 비중은 전체 섭취열량 대비 65%, 유통량 대비 34.1%에 달하고 있고 향후 지속적으로 증가될 것으로 전망되고 있어 수입국의 기후변화를 고려한 식품의 안전관리가 요구**되고 있다.

○ 따라서 미래를 정확하게 예측하기는 어렵지만 기후변화와 아플라톡신에 관한 정보를 제공하고 식품안전관리에서도 장기적인 안목으로 정책을 수립할 필요가 있다.(식품안전, 2013)

○ 유럽은 위해식품 발생 시 회원국 간 신속한 정보교류 및 통일된 식품안전관리체계를 구축하고자, EU 내에서 유통되거나 제 3국에서 수입되는 식품과 사료에 대해 **'식품 및 사료 신속경보시스템 (RASFF: Rapid Alert System for Food and Feed)'을 운영**하고 있다. RASFF에는 31개 회원국이 참여하여 운영하고 있다.

- **2012년 RASFF**를 통해 고지된 전체 **리콜식품 발생 건수는 635건으로 이중 585건이 aflatoxin이며 ochratoxin은 35건 deoxynivalenol은 11건으로 나타났다. 이중 aflatoxin 585건 중에서 nuts, nut products and seeds 가 320건으로 가장 많았고, feed는 119건이며, fruits and vegetables는 78건**으로 나타났다. 호두 등의 견과류와 사료에서 많은 곰팡이독소가 발생하는 것으로 나타났다.

표 2. RASFF에 의한 회수 현황(2012년)

hazard	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
aflatoxins	288	762	839	946	801	705	902	638	649	585
deoxynivalenol (DON)						10	4	3	2	11
fumonisins		15	14	2	15	9	2	1	3	4
ochratoxin A	14	26	27	42	54	30	20	27	34	35
patulin				6	7		3			
zearalenone					1	6	2			
total mycotoxins	**302**	**803**	**880**	**996**	**878**	**760**	**933**	**669**	**688**	**635**

product category	aflatoxins	DON	fumonisins	ochratoxin A
cereals and bakery products	13	11	4	5
feed	119			1
fruits and vegetables	78			10
herbs and spices	51			17
nuts, nut products and seeds	320			
other	4			2
total	**585**	**11**	**4**	**35**

[16] Commission Regulation (EU) No 165/2010 of 10 February 2010 amending Commission Regulation (EC) NO 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins (OJ L 50, 27.2.2010, p. 8)

나. 국내 곰팡이독소 기준 현황

○ 국내 곰팡이독소기준은 아플라톡신인 경우에는 곡류 및 그 가공품, 장류 밀가루 등의 15ug/kg이하이며, 오크라톡신A는 곡류 및 그 단순가공품, 인스턴트 커리, 메주는 각각 5, 10, 20 ug/kg이다.

○ 데옥시니발레놀은 곡류 및 그 단순가공품은 1 mg/kg, 옥수수 및 그 단순가공품은 1 mg/kg으로 다른 독소보다는 높게 되어 있다. 제랄레논의 경우에는 곡류 및 그 단순가공품은 200 ug/kg과 과자는 50ug/kg으로 규정되어 있다. (아래 표 참조)

(1) 총 아플라톡신(B_1, B_2, G_1 및 G_2의 합)

대 상 식 품	기 준(μg/kg)
곡류, 두류, 땅콩, 견과류 및 그것을 단순 처리한 것(분쇄, 절단 등)	15.0 이하 (단, B_1은 10.0 이하이어야 한다)
곡류가공품 및 두류가공품 (규격외 일반가공식품)	
장류 및 고춧가루 및 카레분	
육두구, 심황(강황), 건조고추, 건조파프리카 및 이를 함유한 천연향신료	
밀가루	
건조과실류	
영아용 조제식, 성장기용 조제식, 영·유아용 곡류조제식, 기타 영·유아식	- (B_1은 0.10 이하이어야 한다)
과자류 (제 5. 1. 과자류; 땅콩 및 견과류 함유제품에 한함)	15.0 이하 (단, B_1은 10.0 이하이어야 한다)
땅콩 또는 견과류 가공품류 (제 5. 29-1. 땅콩 또는 견과류 가공품류)	
팝콘용옥수수가공품 (제 5. 29-11. 팝콘용옥수수가공품)	
찐쌀 (제 5. 29-14. 찐쌀)	

(2) 아플라톡신 M_1

대 상 식 품	기 준(μg/kg)
제조.가공직전의 원유 및 우유류	0.50 이하
조제유류(조제분유, 조제우유, 성장기용 조제분유, 성장기용 조제우유, 기타조제분유, 기타조제우유), 특수용도식품(영아용 조제식, 성장기용 조제식, 영·유아용 곡류조제식, 기타 영·유아식, 영·아용 특수조제식품) 중 유성분 함유제품	0.025 이하 [분말제품의 경우 희석하여 섭취하는 형태(제조사가 제시한 섭취방법)를 반영하여 기준적용]

(3) 파툴린(Patulin)

대 상 식 품	기 준(μg/kg)
사과쥬스 사과쥬스농축액(원료용 포함, 농축배수로 환산하여)	50 이하
영아용 조제식, 성장기용 조제식, 기타 영·유아식	10.0 이하

(4) 푸모니신(Fumonisin)

대 상 식 품	기 준(mg/kg) (B_1 및 B_2의 합으로서)
옥수수	4 이하
옥수수를 단순 처리한 것(분쇄, 절단 등)	2 이하
옥수수를 단순 처리한 것이 50% 이상 함유된 곡류가공품 및 시리얼류 팝콘용옥수수가공품	1 이하
과자류 (제 5. 1. 과자류; 옥수수 50% 이상 함유제품에 한함)	1 이하

(5) 오크라톡신 A(Ochratoxin A)

대 상 식 품	기 준(μg/kg)
곡류 및 그것을 단순 처리한 것(분쇄, 절단 등)	5.0 이하
커피콩, 볶은커피	
인스턴트커피	10.0 이하
메주	20 이하
고춧가루	7.0 이하
포도주스, 포도주스농축액(원료용 포함, 농축배수로 환산하여), 포도주	2.0 이하
건조과실류	10.0 이하
영아용 조제식, 성장기용 조제식, 영·유아용 곡류조제식, 기타 영·유아식	0.50 이하

(6) 데옥시니발레놀(Deoxynivalenol)

대 상 식 품	기 준(mg/kg)
곡류 및 그것을 단순 처리한 것(분쇄, 절단 등, 다만 옥수수 및 그것을 단순처리한 것은 제외)	1 이하
옥수수 및 그것을 단순 처리한 것(분쇄, 절단 등)	2 이하
시리얼류	0.5 이하
영아용 조제식, 성장기용 조제식, 영·유아용 곡류조제식, 기타 영·유아식	0.2 이하
면류	0.75 이하

(7) 제랄레논(Zearalenone)

대 상 식 품	기 준(μg/kg)
곡류 및 그것을 단순 처리한 것(분쇄, 절단 등)	200 이하
과자	50 이하
영아용 조제식, 성장기용 조제식, 영·유아용 곡류조제식, 기타 영·유아식	20 이하
시리얼류	50 이하

다. 곰팡이독소 검출 농산물 및 식품

○ 식품의 안전성에 위협을 가하는 위해인자 가운데 곰팡이 독소는 세계 식량 농작물의 25%에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 이 가운데 아플라톡신(aflatoxin)은 *Aspergillus flavus, Aspergillus parasiticus* 및 *Aspergillus nomius* 등, 주로 *Aspergillus* section *Flavi*에 속하는 곰팡이가 폴리케타이드 경로(polyketide pathway)를 통해 생산하는 디푸라노쿠마린 유도체(difuranocoumarin derivatives)에 속하는 곰팡이독소이다.(Varga, Frisvad and Samson, 2011).

- 특히 *A. flavus, A. parasiticus*는 전 세계 토양에 흔히 분포되어 있는 곰팡이로 온대지방에서는 잘 서식하지 않고 주로 고온 다습한 열대나 아열대 지방에 널리 분포한다. 이들 곰팡이들은 주로 **쌀, 밀, 옥수수 등의 곡류, 견과류 및 향신류 등을 기질로 하여 독소를 생성하기 때문에 이러한 농작물이나 이를 가공한 식품 및 사료에서 아플라톡신이 검출**되고 있다.
- 논문상의 자료를 살펴보면, 식용유지, 영유아용 식품, 곡류, 견과류, 그 가공품등에서 주로 검출되었다.

표 3. 곰팡이 독소 검출 현황

검사항목	분석결과	참고문헌
식용유지류 110건 영유아용 식품 106건	불검출 5건에서 B_1 0.06~0.14 ppb 검출	조 등, 2010
향신료 10종 179건 및 건조과실류 137건	건망고, 건딸기류, 건키위 및 건파파야에서는 불검출 건자두 - 평균 0.29, 건포도 - 평균 0.09 검출 건살구 - 평균 0.07 ppb 검출 건무화과 - 총 20건 중 3건에서 최고 0.564 ppb 검출 곶감 - 15건 중 3건에서 G_1 최고 0.88 ppb 검출 육두구 - 평균 2.6 ppb 검출 카레 - 평균 1.0 ppb, 최고 5.4 ppb 검출 심황 - 평균 0.5 ppb, 최고 1.3 ppb 검출 고춧가루 - 평균 1.0 ppb, 최고 5.9 ppb 검출 파프리카분말 - 평균 0.5 ppb, 최고 1.3 ppb 검출	박 등, 2008
곡류, 곡류가공품, 견과류, 견과류가공품, 향신료, 두류, 영유아용식품 등 총 719건	땅콩, 땅콩버터, 기장, 미숫가루, 엿기름, 카레, 된장, 고추장, 깨 등 59건(8.2%)에서 B_1으로는 0.04~4.45, 총 아플라톡신으로는 0.04~5.51 μg/kg 수준으로 아플라톡신이 검출	김 등, 2006
곡류와 견과류 등 140 종	곡류 - 44개 중 16개(38%, 0.07~17.76 ppb) 검출 견과류 - 44개 중 17개(49%, 0.16~44.81 ppb) 검출 향신조미료 - 44개 중 10개(29%, 0.96~8.46 ppb) 검출 주류 - 44개 중 1개(14%, 0.82 ppb) 검출	정 등, 2005
견과류, 국산 11점과 수입산 74점	31개 시료에서 LOD~28.24 ppb 검출	정 등, 2005
견과류 및 그 단순가공품 300건	B_1 - 3.7%, G_1 - 0.7% 검출, B_2 & G_2는 불검출 B_1 검출 식품 - 땅콩버터, 된장, 0.5~2.5 ppb G_1 검출 식품 - 땅콩버터, 메주가루, 0.8~1.1 ppb B_1 & G_1 최고검출농도는 각각 2.5 ppb와 1.1 ppb	이 등, 2002

김소희, 이창희, 손영욱, 장미란, 최인선, 이상목, 조성혜, 박준식, 권은영, 이은진, 손상혁, 김대병. 2006. 식품 중 곰팡이 독소류 실태조사 식품중 총 아플라톡신 실태조사, 식품의약품안전처보고서, 10.

박건상, 오금순, 조태웅, 강경모, 백옥진, 강영운, 노기미.2008. 향신료 및 건조과실류 중 아플라톡신 안전성 평가, 식품의약품안전처연구보고서, 12.

정덕화. 2005. 곰팡이독소의 국가안전관리체계구축을 위한 연구 -아플라톡신을 중심으로-, 국립독성연구원

조대현. 2010. 식용유지 및 영유아용식품 중 아플라톡신 실 태조사. 식품의약품안전평가원.

이종옥, 소유섭, 김미혜, 박성국, 정소영, 이윤동, 정계훔, 엄지윤. 2002. 식품 중 곰팡이독소 모니터링 연구(II)-식품 중아플라톡신 오염도 조사, 식품의약품안전처연구보고서, 6,83-88.

라. 곰팡이독소의 복합 오염

- 식품 및 사료 성분 한 가지에도 여러 가지 곰팡이독소가 생성될 수 있기 때문에 복합오염이 발생할 수 있다. 즉 **여러 가지 곰팡이독소들이 오염된 원료나 성분을 함유함으로써 한 식품 또는 사료에서 발견된다.**
- 2006년에 갈바노 등은 **옥수수를 관찰**하여 중국에서 **아플라톡신 B_1과 푸모니신 B_1, 베트남에서 아플라톡신 B_1, 푸모니신 B_1, 디옥시니발레놀(DON), 니발레놀(NIV) 등**이 복합 오염된 것을 발견했다.
- 또 한국(수입 옥수수로 추정됨)에서는 제랄레논, DON, NIV, 아플라톡신B_1, 푸모니신 B_1, 오클라톡신, 인도네시아에서는 아플라톡신 B_1, 푸모니신 B_1, DON, NIV, 제랄레논, 브라질에서는 아플라톡신류, 푸모니신 B_1, 제랄레논, 가나에서 아플라톡신, 푸모니신 B_1,

○ 미국에서 **Moniliformin(모닐리포르민)과 푸모니신 B_1, 이탈리아에서는 DON과 푸모니신이 복합 오염된 것을 보고**하였다(한돈 2014 양돈산업과 곰팡이독소 피해).

마. 국내외 현황

1) 국내현황

가) 곰팡이독소 진단 키트 개발 현황

○ 현재 시장에 나와 있는 **국산 Mycotoxin 진단 키트제품은 없으며, 전량 외국제품을 수입하고 있다.**

2) 국외 현황

가) mycotoxin 정량 방법현황

○ 외국에서는 11개정도의 mycotoxin 진단키트가 판매되고 있으며, 검출한계는 1 ~ 100ng 정도로 정성 또는 정량을 할 수 있다. ELISA 방법뿐만 아니라 immunoaffinity columns, Lateral flow test 제품 등도 선보이고 있다.

○ **현재 판매되고 있는 진단키트의 제품에는 단일 독소에 대한 검출만을 하고 있다**. 이것은 ELISA 의 특성상 단일 효소(Alkaine phosphatase 등)을 conjugated. 시켜서 효소반응으로 나타난 color를 microplate reader로 정성 및 정량분석하고 있다.

○ 일반적으로 높은 민감도(반응당 10~100ng)를 나타내고 있는 ELISA이나 **아플라톡시 M_1**은 조제유류, 분유 특수용소식품 등에 0.025ug/kg(이는 25ng/kg) 즉 0.025ppb가 식품위생법상 기준인데 **이를 확인하기에는 검출한계(The Limit of Detection)에 근접하여 확인 및 정량하는데 어려움**이 있다.

표 4. 아플라톡신 M_1 관련 식품위생법 기준

대 상 식 품	기 준(μg/kg)
조제유류(조제분유 등), 특수용도식품(영아용 조제식) 중 유성분 함유제품	0.025 이하 [분말제품의 경우

표5. 외국의 Mycotoxin 검출 키트

제품명	원리	제조자	국가	비고
MaxSignal® ELISA Test Kit	ELISA	Bioo Scientific	미국	정량
MycoFlow™ Total Aflatoxin Strip Test Kit	크로마토그래피 (Strip type)	Bioo Scientific	미국	정량
AgraQuant® ELISA Test Kit	ELISA	Romer	미국	정량
AgraStrip™Total Aflatoxin Test Kit	크로마토그래피 (Strip type)	Romer	미국	정성
Reveal for Aflatoxin, DON, Fumonisin (Sensitivity 20ppb)	크로마토그래피 (Strip type)	Reveal	미국	정성
Neogen's Reveal® Q+, a quantitative test	크로마토그래피 (Strip type)	Neogen	미국	정성
Neogen's Agri-Screen®	크로마토그래피 (Strip type)	Neogen	미국	정성
Neogen's NeoColumn™ for aflatoxin, DON (vomitoxin), ochratoxin, T-2/HT-2 and zearalenone	immunoaffinity columns	Neogen	미국	정성
Aflatoxin, Citrinin,DON, Fumonisin, Ochratoxin, Zearalenone test systems	Lateral flow test ELISA	R-Biopharm	미국	정성
Charm II Aflatoxin Kits	Lateral flow test	Charm	미국	정성
Aflatoxin M_1 ELISA Kit (DEIA033)	ELISA	Creative Diagnostics	미국	정량
Immunoaffinity Columns (IAC) Detection	IAC	Biocheck	영국	정성
Rapid Strip Tests	Strip	Biocheck	영국	정성

라. 기존의 Mycotoxin 검출키트와 Immuno-PCR의 비교

○ 기존의 방법은 ELISA로 정량분석을 하나 Immuno-PCR은 여기에 real time PCR을 추가하여 민감도를 더욱 높였다. 기존의 방법보다 1,000 배 높은 것으로 되어 있고, 순수 국산으로 제작될 경우 저렴한 가격으로 제공될 수 있을 것으로 보인다.

표 6. 기존의 Mycotoxin 검출키트와 Immuno-PCR의 비교

구분	기존의 Mycotoxin 검출키트	Immuno-PCR 키트
방법	ELISA	ELISA + real time PCR
시간	2시간	2시간 30분
민감도	10~100ng	1~10pg
요구되는 기기	ELISA reader	Real time PCR 기기
가격	15,000원/rxn	10,000원/rxn

마. 문제점 및 전망

○ 세계적인 검출진단 kit 개발 회사들은 Mycotoxin 검출에 반응성과 특이성이 높은 우수한 품질의 항체들을 개발하는데 많은 노력을 기울기고 있으며 최근 일부 선두기업들은 우수한 품질의 단클론 항체를 개발하여 기존에 사용하던 다클론 항체와 조합하여 특이도 및 민감도를 더욱 향상시킨 제품들을 개발하고 있다.

○ 매년 전 세계의 25%의 작물들이 곰팡이질병과 곰팡이 독소로 인해 피해를 입고 있으며 오염

된 곰팡이 독소로 인해 질병도 증가하고 있다. 이에 농산물에 오염된 **Mycotoxin에 대한 분석법과 진단 kit의 개발이 요구되어 진다.** Mycotoxin 진단기술은 외국제품의 ELISA 진단키트 또는 HPLC, GC, LC/MS 등의 방법을 통해서 확인해야 하나 진단기기 비용이나 시간이 많이 들며, 전문성 등이 있어야 하는 어려운 점이 있다.

- 하지만 본 연구과제를 통해 제작될 **Immnuno-PCR을 이용한 mycotoxin 정량검출 기술**은 보다 높은 민감도를 가진 방법이며, **국산화를 시킴으로써 외화절감 및 새로운 방법으로 외국 수출로도 기대가 될 것이다.**
- LC, GC, LC/MS/MS 보다 상대적으로 저가인 real-time PCR기기를 이용하는 것으로 쉽게 접근이 가능하며, **민감도도 1,000배 이상으로 저농도(1pg)로 유해성이 있는 곰팡이독소를 검출**하는 방법이라 할 수 있다.
- 본 기술이 상용화되면 식**품 중 세균성독소(보툴리늄독소, 바실러스 장독소, 클로스트리디움 장독소) 뿐만 아니라 높은 sensitivity로 암세포가 가지고 있는 마커들을 정량적으로 확인할 수 있는 도움이 될 것**으로 보인다.

제 2 장 연구수행 내용 및 결과

제 1 절 Immuno-PCR을 이용한 Mycotoxin 정량분석법 개발

1. 기보유한 Aflatoxin B_1, Deoxynivalenol, Ochratoxin A 단클론항체중 최적의 단클론항체 선정

가. Aflatoxin B_1 단클론 항체 선정

(1) 복수 제작 및 정제: 3 hybridoma cells

- hybridoma cell을 복강에 주입하기 5일전에 8주령의 male Balb/c mouse에 Pristane을 0.5mL씩 주입
- 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지에서 hybridoma cell을 배양함.
- cell을 모아 counting한 후 1,200rpm x 5min. 원심분리한 후 배지 상층액을 제거함.
- 마우스 당 1x 10^7 cell이 되게 PBS로 부유시켜 복강에 0.2mL을 주입함.
- 9-10일 후 복수가 차면 복수를 주사기를 이용하여 회수함.
- 복수를 2,500rpm x 10min. 원심분리 후 상층액을 protein G binding buffer로 5배 희석하여 0.2um syringe filter를 이용하여 여과함.
- 여과한 복수를 protein G bead에 loading한 후 binding buffer를 흘려 세척함.
- Elution buffer로 bead에 binding한 IgG를 모은 후, PBS로 버퍼교환하여 -70℃에 보관하면서 다음 실험에 사용함.

(2) 항체 역가측정

- Carbonate buffer(pH9.6)에 Aflatoxin B_1-BSA conjugate를 1ug/ml되게 희석하여 ELISA plate well 넣고 4℃에서 overnight 반응시켜 coating 함.
- 세척액 PBST(PBS buffer+0.5% Tween20)로 3번 세척한 후, 정제한 항체를 10,000ng ~0.25ng/mL까지 PBS에 희석하여 coating한 plate에 100uL씩 넣고 37℃에서 1시간 반응시킴.
- 세척액으로 3번 세척한 후, goat anti-mouse IgG-HRP conjugate를 넣고 37℃에서 1시간 반응시킴.
- 세척액으로 5번 세척한 후, TMB solution을 넣고 20분 반응시킴.
- Stop solution을 넣고 450nm에서 흡광도를 측정함.
- 3개의 hybridoma cell 중 1F1이 동일 항체량을 사용했을 때 역가가 가장 높은 것으로 확인됨.

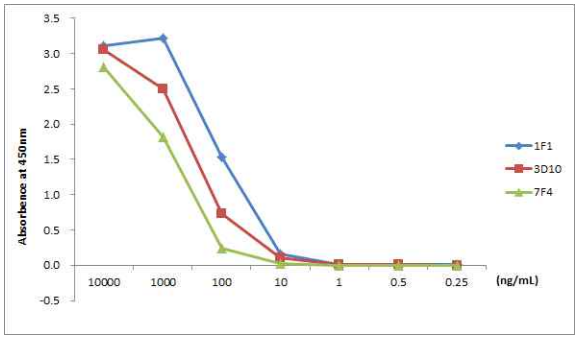


그림 1. Titration of 3 kinds MAb against Aflatoxin B_1 by ELISA

(3) Aflatoxin B1 항체의 교차반응 확인

- Aflatoxin B_1-BSA conjugate를 1ug/mL되게 carbonate buffer에 희석하여 4℃에서 overnight coating 함.
- Conjugate가 coating 된 plate를 3번 세척한 후, 정제한 monoclonal antibody Aflatoxin B_1 항체를 100ng/mL로 희석하여 각 well에 B_1, B_2, G_1 그리고 G_2 톡신의 1, 10, 100, 1000 ng/mL과 함께 넣고 1시간 반응시킴.
- 반응이 완료되면 3번 세척 후 goat anti-mouse IgG-HRP(5,000배 희석)넣고 37℃에서 1시간 반응시킴.
- 세척액으로 5번 세척한 후, TMB solution을 넣고 20분 반응시킴.
- Stop solution을 넣고 450nm에서 흡광도를 측정함.
- 1F1 hybridoma cell이 저농도와 고농도에서 반응성이 높고 B_1, G_1 그리고 G_2 톡신에 대해 교차반응성이 낮은 것으로 확인됨.

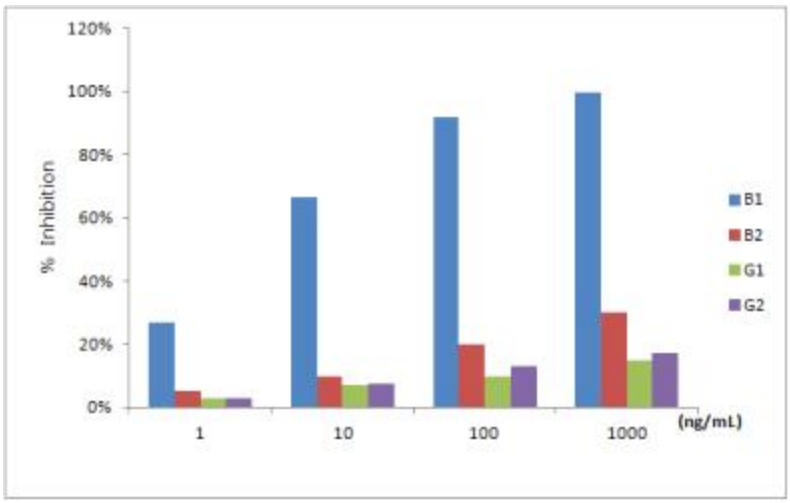


그림 2. Cross-reactivity of anti-Aflatoxin B_1 1F1 clone

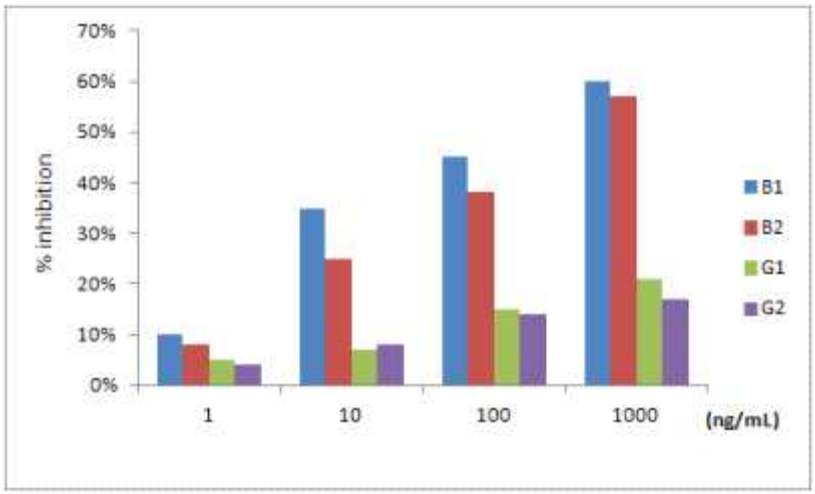


그림 3. Cross-reactivity of anti-Aflatoxin B_1 3D10 clone

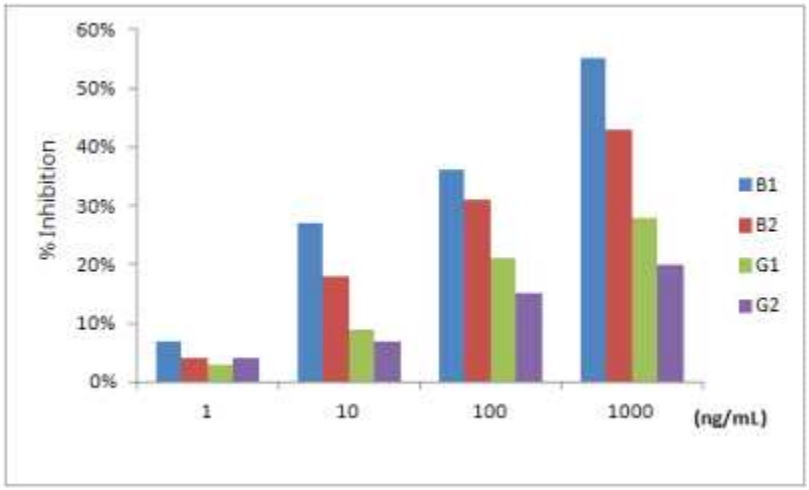


그림 4. Cross-reactivity of anti-Aflatoxin B_1 7F4 clone

나. Deoxynivalenol 단클론 항체 선정

(1) 복수 제작 및 정제: 2 hybridoma cells

- Aflatoxin B_1과 같은 방법으로 cell 배양, 복수제작 및 정제 실시함.

(2) 항체 역가측정

- Carbonate buffer(pH9.6)에 Deoxynivalenol-BSA conjugate를 1ug/ml되게 희석하여 ELISA plate well 넣고 4℃에서 overnight 반응시켜 coating 함.
- 세척액 PBST(PBS buffer+0.5% Tween20)로 3번 세척한 후, 정제한 항체를 10,000ng ~0.25ng/mL까지 PBS에 희석하여 coating한 plate에 100uL씩 넣고 37℃에서 1시간 반응시킴.
- 세척액으로 3번 세척한 후, goat anti-mouse IgG-HRP conjugate를 넣고 37℃에서 1시간 반응시킴.
- 세척액으로 5번 세척한 후, TMB solution을 넣고 20분 반응시킴.
- Stop solution을 넣고 450nm에서 흡광도를 측정함.
- 2개의 hybridoma cell 중 6H2 clone이 동일 항체량을 사용했을 때 역가가 더 높은 것으로 확인됨.

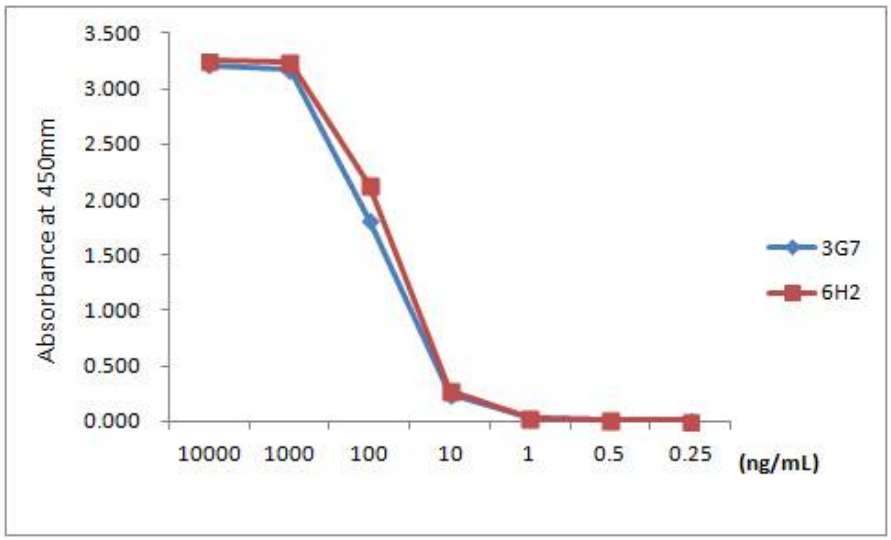


그림 5. Titration of 2 kinds MAb against deoxynivalenol by ELISA

(3) Deoxynivalenol(DON) 항체의 교차반응 확인

- Deoxynivalenol-BSA conjugate를 1ug/mL되게 carbonate buffer에 희석하여 4℃에서 overnight coating 함.
- Conjugate가 coating된 plate를 3번 세척한 후, 정제한 monoclonal antibody DON 항체를 100ng/mL로 희석하여 각 well에 DON, Ochratoxin A, Aflatoxin B_1 그리고 G1 톡신의 1, 10, 100, 1000 ng/mL과 함께 넣고 1시간 반응시킴.
- 반응이 완료되면 3번 세척 후 goat anti-mouse IgG-HRP(5,000배 희석)넣고 37℃에서 1시간 반응시킴.
- 세척액으로 5번 세척한 후, TMB solution을 넣고 20분 반응시킴.
- Stop solution을 넣고 450nm에서 흡광도를 측정함.
- 6H2 hybridoma cell이 DON 톡신의 저농도와 고농도에서 반응성이 높고 ochratoxin A, Aflatoxin B1, G1 톡신에 대해 교차반응성이 낮은 것으로 확인됨.

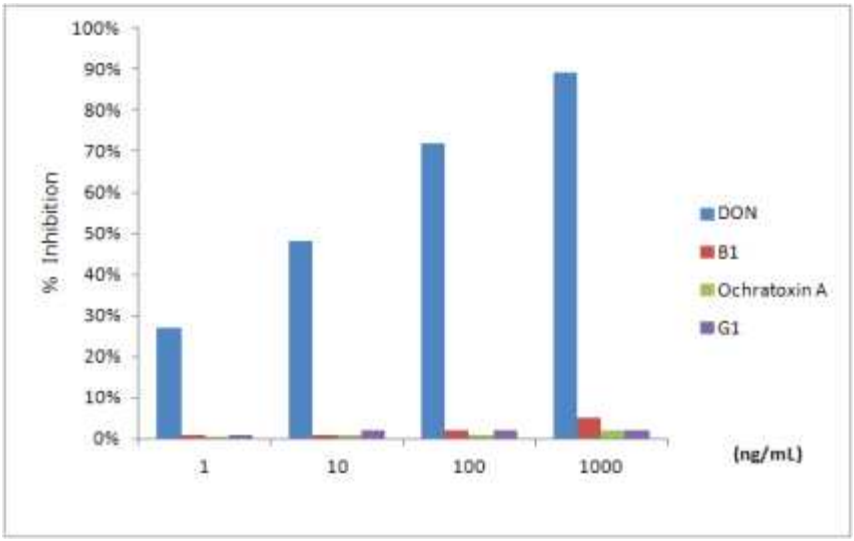


그림 6. Cross-reactivity of anti-deoxynivalenol 3G7 clone

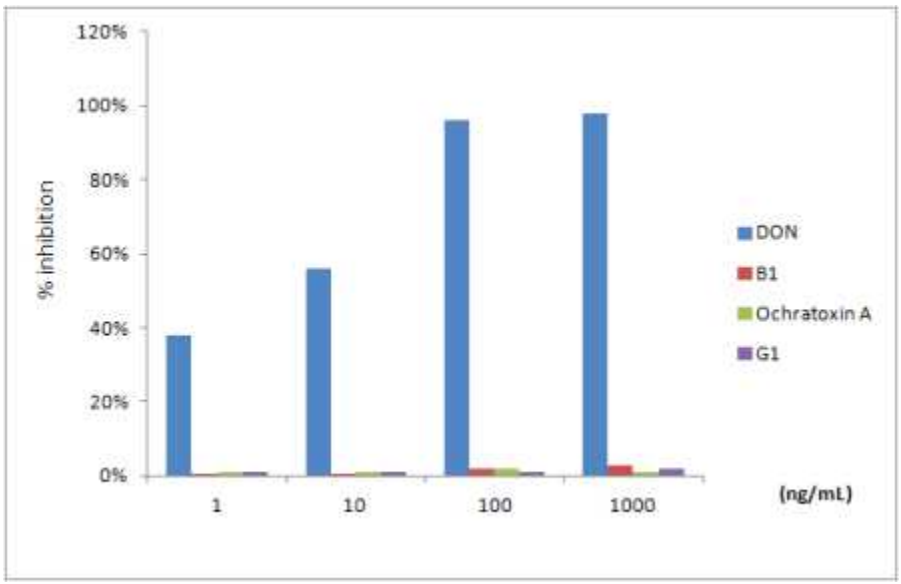


그림 7. Cross-reactivity of anti-deoxynivalenol 6H2 clone

다. Ochratoxin A 단클론 항체 선정

(1) 복수 제작 및 정제: 2 hybridoma cells

- Aflatoxin B_1과 같은 방법으로 cell 배양, 복수제작 및 정제 실시함.

(2) 항체 역가측정

- Carbonate buffer(pH9.6)에 Ochratoxin A-BSA conjugate를 1ug/ml되게 희석하여 ELISA plate well 넣고 4℃에서 overnight 반응시켜 coating 함.
- 세척액 PBST(PBS buffer+0.5% Tween20)로 3번 세척한 후, 정제한 항체를 10,000ng ~0.25ng/mL까지 PBS에 희석하여 coating한 plate에 100uL씩 넣고 37℃에서 1시간 반응시킴.
- 세척액으로 3번 세척한 후, goat anti-mouse IgG-HRP conjugate를 넣고 37℃에서 1시간 반응시킴.
- 세척액으로 5번 세척한 후, TMB solution을 넣고 20분 반응시킴.
- Stop solution을 넣고 450nm에서 흡광도를 측정함.
- 2개의 hybridoma cell 중 9C2 clone이 동일 항체량을 사용했을 때 역가가 더 높은 것으로 확인됨.

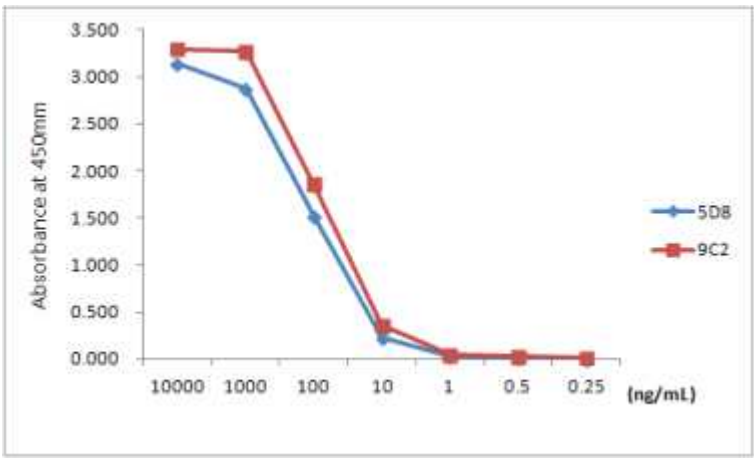


그림 8. Titration of 2 kinds MAb against ochratoxin A by ELISA

(3) Ochratoxin A 항체의 교차반응 확인

- Ochratoxin A-BSA conjugate를 1ug/mL되게 carbonate buffer에 희석하여 4℃에서 overnight coating 함.
- Conjugate가 coating된 plate를 3번 세척한 후, 정제한 monoclonal antibody ochratoxin A 항체를 100ng/mL로 희석하여 각 well에 Ochratoxin A, Ochratoxin B, Aflatoxin B_1 그리고 G_1 톡신의 1, 10, 100, 1000 ng/mL과 함께 넣고 1시간 반응시킴.
- 반응이 완료되면 3번 세척 후 goat anti-mouse IgG-HRP(5,000배 희석)넣고 37℃에서 1시간 반응시킴.
- 세척액으로 5번 세척한 후, TMB solution을 넣고 20분 반응시킴.
- Stop solution을 넣고 450nm에서 흡광도를 측정함.
- 9C2 hybridoma cell이 5D8 clone 보다 ochratoxin A와 ochratoxin B의 저농도와 고농도에서 반응성이 높고 Aflatoxin B_1, G_1 톡신에 대해 교차반응성이 낮은 것으로 확인됨.

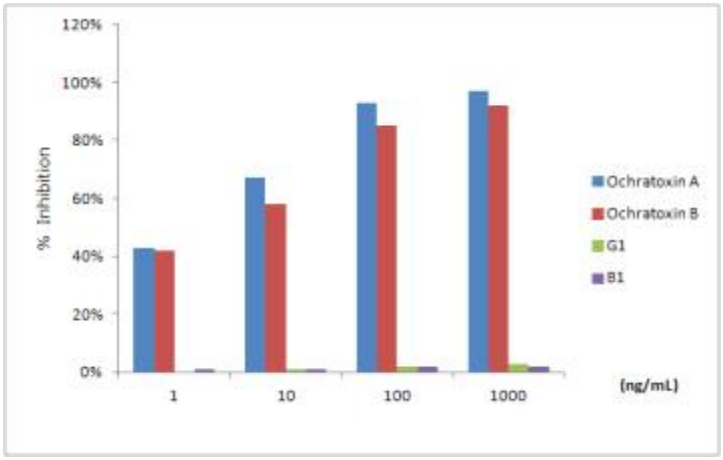


그림 9. Cross-reactivity of anti-ochartoxin A 5D8 clone

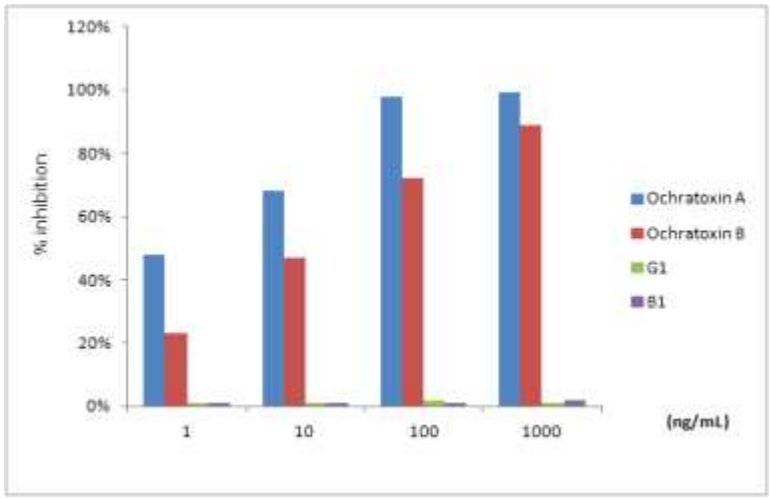


그림 10. Cross-reactivity of anti-ochratoxin A 9C2 clone

2. Aflatoxin M_1, T-2 mycotoxin, Zearalenone 단클론 항체 제작

가. Balb/c mice에서 mycotoxin 특이 항체 유도 및 생산

(1) 항원: mycotoxin은 분자량이 작아 동물체내에서 강한 면역반응을 이끌어 내기가 힘들다. 이를 극복하기 위하여 immunogenicity가 낮은 small molecule을 immunogenicity가 높고 분자량이 큰 carrier protein에 conjugation 하여 target antigen에 대한 면역반응을 증가시킬 수 있는 hapten-carrier 제작하여 immunization 시켰음(그림 11). 이 실험에서 hapten은 3 가지 mycotoxin (Aflatoxin M_1, T-2 mycotoxin, Zearalenone)이며 carrier protein으로는 BSA를 사용하였다.

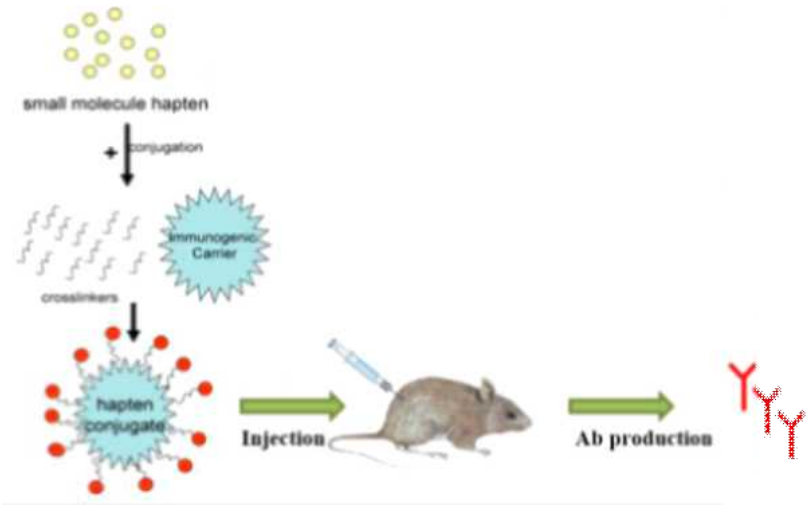


그림 11. Hapten-carrier를 이용한 small molecule에 대한 항체 생성 유도. 이번 실험에서 mycotoxin은 hapten으로 사용되어졌으며, carrier protein으로는 BSA를 사용하였다.

(2) Mouse Immunization: 항체 생산을 위한 mouse immunization은 준비된 항원을 이용하여 Park at al. (Veterinary Immunology and Immunopathology, 2015)의 방법을 응용하였다. 간략하게 서술하면, 항원을 Freund's complete adjuvant (Thermo Scientific)와 혼합하여 준비하고 BALB/c mice에 50 ul씩 1차 면역하고 2 주 간격으로 3-4 번 동일한 항원을 Freund's incomplete adjuvant와 혼합하여 SC로 injection 하였다. Mouse tail에서 소량의 blood를 채취하여 혈청 분리 후, mouse 체내 mycotoxin에 대한 항체 생성 유무를 ELISA로 판별하여, 항체 생성 시 다음 단계로 진행하였다.

(3) 세포융합 및 hybridoma의 선발

○ **Myeloma cell 배양**: 세포융합에 사용할 myeloma cell은 SP2.O cell line을 이용하였으며, 세포융합 1 주일 전 배양을 시작하였다. 배양 조건은 10% inactivated fetal bovine serum을 첨가한 DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium)배지에 오염방지 목적으로 antibiotics (100U penicillin G, 100㎍ streptomycin, 0.25㎍ amphoterecin B/㎖, Gibco BRL.)을 첨가한 후 myeloma cell을 접종하여 배양하였다. 1주간 배양한 후 아래와 같이 사용하였다.

○ **단클론항체 분비 B cell을 포함한 비장세포 분리** : 항체 형성을 확인 후, 항원 접종 된 mouse의 비장을 세절 후. mesh로 갈고, 기타 debris들을 채를 사용하여 제거한 후, 분리된 spleen cell 들을 DMEM 배지를 사용하여 3회 정도 원심을 이용하여 세척한다. Trypan blue 용액과 cell cytometer를 이용하여 분리된 세포의 수를 카운트하였다.

○ **세포융합** : 대수증가기에 있는 myeloma cell을 계수하여 분리한 림프구와 1:5의 비율이 되도록 혼합하여 원심을 이용하여 농축한 후, 37℃로 유지된 50% polyethylene glycol 1500 (PEG1500, Boeringer Mannheim. Co.)을 1.2 ~1.5㎖을 1분 동안 천천히 가하고 30초간 정치시킨 후, 여기에 DMEM 1, 2, 8 및 10 ㎖로 서서히 단계 희석하고, 이를 1000rpm에서 10분간 원심하여 침전된 세포를 myeloma cell 부유액에 서서히 부유시켰다. 여기에 2X HAT (Hypoxanthine, aminopterin, thymidine)배지 20㎖을 가하여 96 well microplate에 100㎕ 씩 분주한 후 배양하였다. 이후 2일 간격으로 1X HAT 배지로 feeding 한 후, 10일 후 HT (Hypoxanthine, thymidine)배지로 바꾸고 4일 간 더 배양하였다.

○ **Mycotoxin 특이 항체생성 hybridoma cell의 선별 및 클로닝** : 96 well plate에서 HT medium으로 4일간 추가 배양한 cell들의 supernatant를 채취하여 BSA-mycotoxin conjugate protein으로 coating 된 ELISA plate를 이용하여 항원에 반응하는 항체를 생산하는 hybridoma cell line을 포함한 well을 선별하였다. 선별된 well의 cell들을 증식시키기 위하여, 면역시키지 않은 마우스의 thymocytes (feeder cells)를 얻은 다음 HT 배지에 부유시키고 24well에 1㎖씩 분주하였다. 그 후 24 well plate에 옮겨 대수증가기에 이르도록 기다린 후, 클로닝 하루 전에 96 well plate에 feeder cell을 깔고 융합 잡종세포수가 ㎖당 0.5 cell 이하가 되도록 HT 배지에 부유시켜 준비된 plate의 각 well에 분주 하였다. 배양 후 single colony가 형성된 well들을 현미경으로 확인하고, 이러한 well에서 채취한 세포 배양액을 이용하여 다시 한 번 ELISA를 통해서 항체 생성여부를 확인하였다. 확인된 cell line은 계대 배양하여 Cell line을 확립하였다. ELISA 실험은 아래와 같이 진행 되었다.

○ **항체 screening을 위한 ELISA 실험 방법**

1. Mouse immunization에 사용되어진 BSA-mycotoxin conjugate, carrier protein을 각 각carbonate buffer(pH9.6)에 1ug/ml이 되게 희석한 후 ELISA plate에 100 ul /well 씩 넣고 4℃에서 overnight 시켜 항원을 coating 하였다.
2. 다음 날, 200 ul PBST (0.5% Tween20 in PBS)로 3번 세척한 후, 각 각의 hybridoma cell의 배양액을 PBS에 2배 희석한 후, 100uL씩 well에 분주 한 후 37℃에서 1시간 반응시켰다.
3. PBST로 3번 wash한 후, HRP conjugated anti-mouse IgG+IgM antibody를 3,000 배 희석한 후 100 ul 씩 분주 한 후 37℃에서 1시간 반응시켰다.
4. PBST로 3번 wash한 후, TMB solution을 넣고 20분 반응시켰다.
5. Stop solution을 넣고 450nm에서 흡광도를 측정하여 negative control (culture medium alone)가 비교하여 흡광도가 높은 배양액을 분비하는 cell line들을 선별하였다.

○ **항체 특이성 확인 및 선별**: ELISA 방법에 의하여 선별된 cell line들의 배양액을 이용하여 mycotoxin 특이 항체를 생산하는 cell line을 dot blotting analysis를 이용하여 특이성의 추가 확인 및 최종 cell line들을 선별하였다. Hapten-carrier를 이용하여 면역시켰을 때, 많은 항체가 carrier protein에 대하여 생성되고, 또한 일부는 hapten에

대하여 생성된다. 그러므로 선별된 cell line 중 hapten (여기서는 mycotoxin)에만 특이적으로 반응하는 항체를 생산하는 특이도 높은 cell line의 선별이 중요하다. 이를 확인하기 위하여 각 각의 clone에 대하여 생산하는 항체의 mycotoxin 특이도를 아래 그림 12와 같이 dot blotting을 통해서 확인하였다. 이를 통하여 최종 cell line을 선별하였다. 실험 방법은 아래와 같다.

○ **Dot blot analysis**

1. Nitrocellulose paper를 넓이 0.5 - 1 cm로 자른 후, 1-2 ul의 BSA 또는 BSA-mycotoxin conjugate를 blotting 한다.
2. Blotting paper가 마른 후, non-fat dry milk를 10% 농도로 PBST (0.2 % tween20 in PBS)에 녹인 다음, paper를 담거 15분간 blocking 한다.
3. 각 각의 항원이 blotting된 paper를 각 각의 클론의 배양액으로 incubation 한다.
4. PBST로 5분간 wash를 3 번 진행한다.
5. HRP-conjugated anti mouse IgG+IgM antibody (2차 항체)를 1:5,000 으로 희석한 뒤 20 분 간 반응 시킨다.
6. PBST로 위와 같이 3 번 wash 한다.
7. ECL-chemiluminescent substrate solution으로 developing 한 후 chemi-doc을 이용하여 반응을 확인한다.

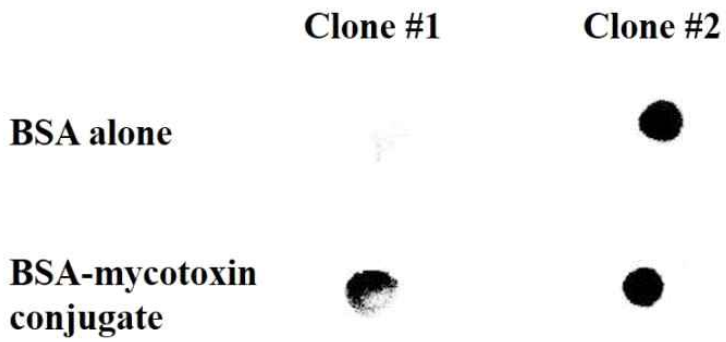


그림 12. Dot blot analysis를 이용한 anti-mycotoxin antibody 특이도 확인. BSA 와 BSA-mycotoxin conjugate를 immuno-blotting paper에 blotting 한 후, 각각의 클론의 배양액을 반응시킨 후, HRP-conjugated anti-mouse immunoglobulin antibody로 반응 시킨 후 developing 하였음. 그림 2는 대표적인 실험 결과를 나타냄. 그림에서 clone #1의 경우 BSA-mycotoxin conjugate에만 반응하며 BSA에는 반응하지 않으므로 mycotoxin의 epitope을 인식함을 알 수 있고, clone #2의 경우 두 가지 항원에 모두 반응함으로 BSA표면의 epitope을 인식함을 알 수 있음. 이러한 실험을 통하여 mycotoxin 특이 항체 생산하는 hybridoma를 선별할 수 있었음.

3. Single-chain variable fragment (scFv) 합성 라이브러리를 이용한 재조합 항체 생산

- 1차 시제품 개발인 **Ochratoxin A** 진단키트의 낮은 sensitivity를 보완하고자 새로운 항체 개발의 필요성으로 인해 재조합 항체 생산 기술을 이용하여 새로운 항체 개발 착수하였음. 추가로 다양한 항체 확보를 위하여 **Aflatoxin B_1** 항체 개발도 동시 개발에 착수함.

(1) Mouse scFv synthetic library를 이용한 단클론 항체 생산 전략

○ 기존에 확보한 scFv expressing phage library를 이용하여, 각각의 mycotoxin에 반응하는 phage들을 enrichment한 후, 개별 clone을 선별하여 CDR에 해당하는 sequence를 확인 및 cloning한 후 293F cell을 이용하여 invitro-expressing 후 정제하여 사용함. 동물을 사용하지 않는 장점과 high diversity를 확보하고 있어, mycotoxin과 같은 저분자량에 대한 항체 생산에 적합함(그림 13).

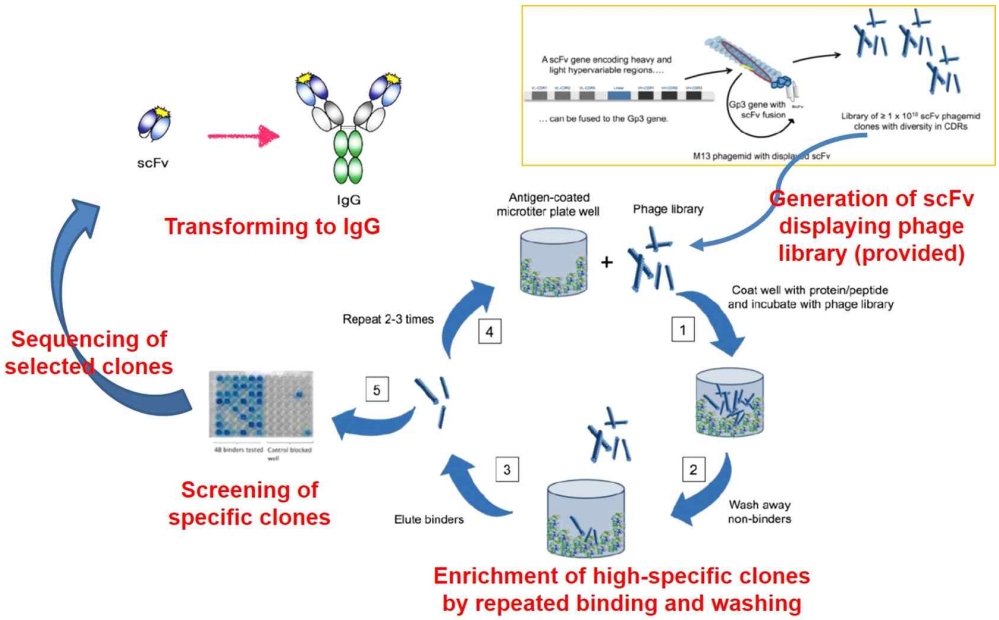


그림 13. Overall flowchart for a synthetic antibody generation using scFv library

(2) 항원제작: 위 마우스를 이용한 항체 생산과 동일한 방법으로 mycotoxin-BSA conjugate 및 BSA를 이용하여 항체 선별에 사용함.

(3) Biopanning을 이용한 항체 선별 방법

○ 단일사슬항체조각(scFv) 라이브러리와 Fab 단편 라이브러리를 이용하여 mycotoxin 2종에 대한 항체라이브러리 선별 실시함. 파지표면제시법 (phage display)을 활용하여 biopanning을 진행함. 항체 선별 시 mycotoxin에만 특이도를 가지는 항체를 얻기 위하여 음성선택과정을 실시 후 양성선택과정을 실행함. 총 4~5 round를 수행하며 단계적으로 항원의 농도를 줄여가며 양성클론들의 양을 enrich 시킴. Screening에 사용된 실험조건은 아래 표 2와 같음.

표 8. Positive phage enrichment processing condition

차수	Screening condition
1차	Antigen concentration: 10 ug, Incubation: 1.5 h, Washing: 4 times
2차	Antigen concentration: 10 ug, Incubation: 1.5 h, Washing: 8 times
3차	Antigen concentration: 5 ug, Incubation: 1.5 h, Washing: 8 times
4차	Antigem concentration: 3 ug, Incubation: 1.5 h, Washing: 8 times

○ 총 4 round의 screening enrichment steps 결과 Aflatoxin B_1의 경우는 선별적으로 잘 enrichment 되었으나, Ochratoxin의 경우는 대조군인 BSA에 비하여 특이적으로 잘 선별되지 않았음(그림 4).

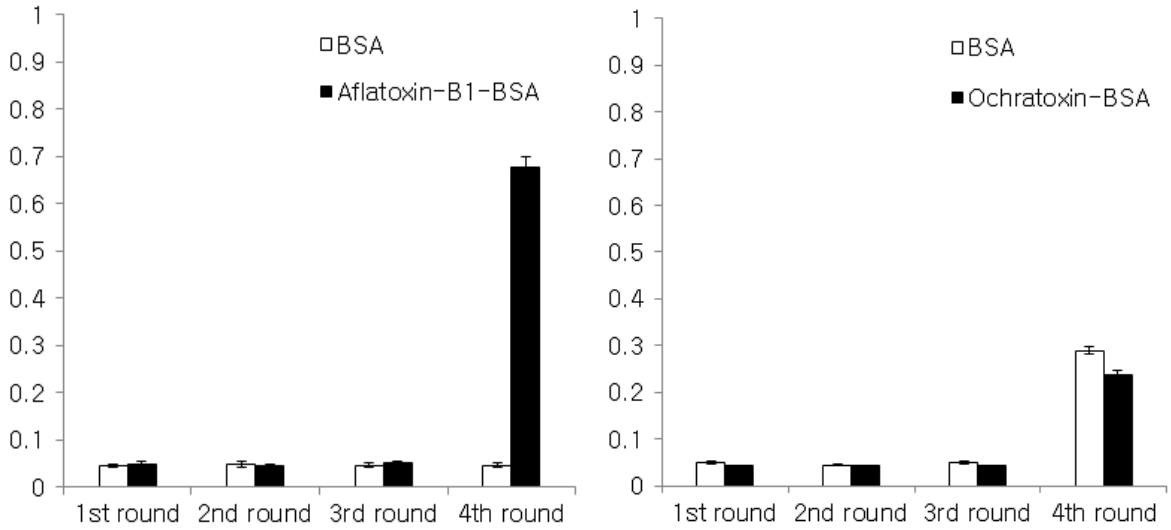


그림 14. Aflatoxin과 Ochratoxin 양성 scFv 발현 phage enrichment 결과

○ 비록 Ochratoxin에 대해서는 충분히 enrichment가 되지 않았으나, 두 mycotoxin 모두에 대하여 1,000 개가량의 개별 colony에 대하여 ELISA 방법으로 스크리닝함. 결과 각 톡신마다 specific clone를 여러 개 분리 할 수 있었음(그림 15와 16).

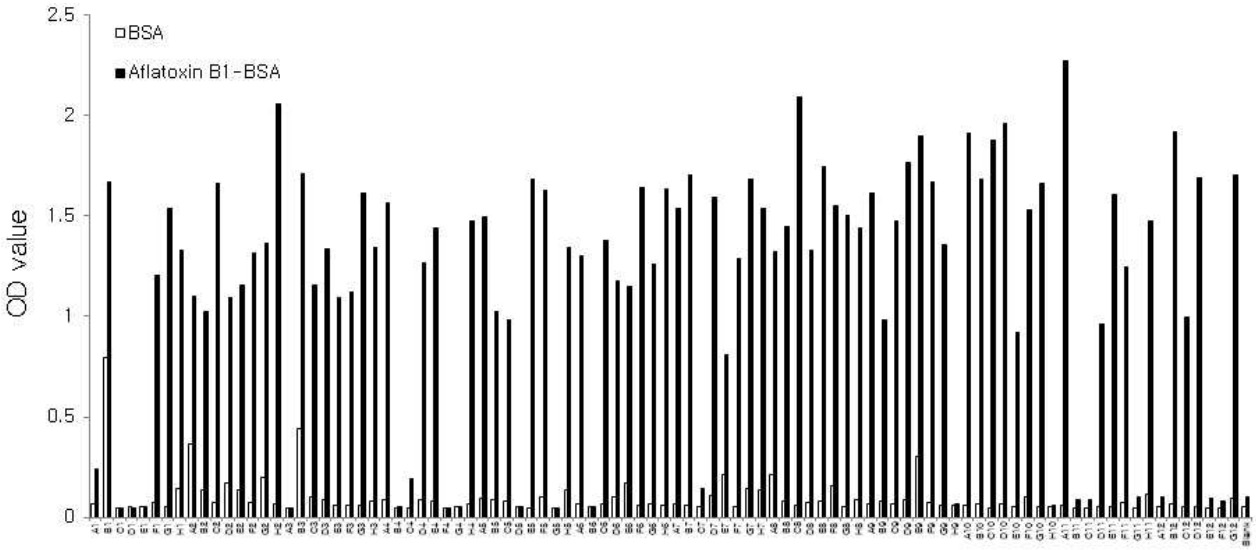


그림 15. Aflatoxin B_1 특이 scFv 콜로니 스크리닝 결과

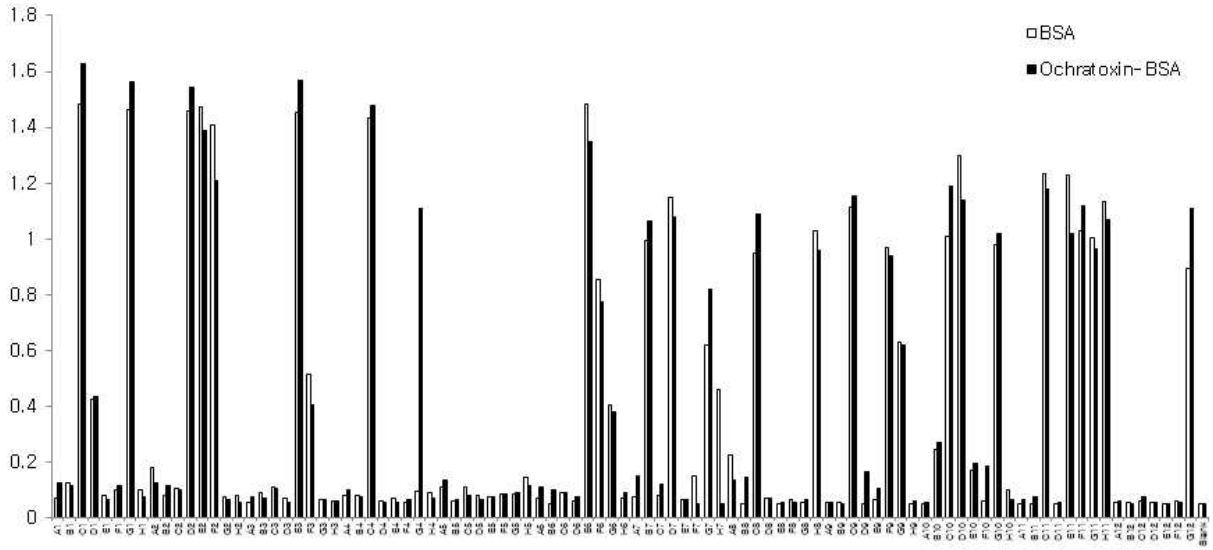


그림 16. Ochratoxin A 특이 scFv 콜로니 스크리닝 결과

○ 선별된 clone에 대하여 CDR 부분을 포함한 variable region을 sequencing하여 각각 아래와 같이 최종 mycotoxin 특이 재조합 항체를 확보함.

Aflatoxin B_1: 1H6,1B12, 1D10, 1C8, 2B12,2D10

Ochratoxin A: 2E5

(4) 재조합 항체 기술 이용 면역글로불린 제작 및 생산 (IgG conversion)

○ 면역글로불린을 생산하기 위해 우선 선별된 단일사슬항체조각 혹은 Fab 단편의 가변부위 염기서열을 면역글로불린 플라스미드로 옮겨주는 클로닝 (cloning) 작업을 함.

○ 단일사슬항체조각의 염기서열은 항체의 중쇄, 경쇄의 가변부위와 그 사이를 이어주는 연결 펩타이드의 염기서열만을 포함하고 있음. 면역글로불린의 중쇄와 경쇄의 불변부위를 가지는 플라스미드로의 클로닝을 시행해야 함. 중쇄 가변부위는 중쇄 불변부위 플라스미드, 경쇄 가변부위는 경쇄 불변부위를 가지는 플라스미드로 각각 클로닝해 준 후 이를 대장균에 형질 전환 시켜 대량의 면역글로불린 중쇄, 경쇄 플라스미드를 확보함(그림 17). 확보된 플라스미드의 서열 분석을 통해 서열이 일치되는지 확인함.

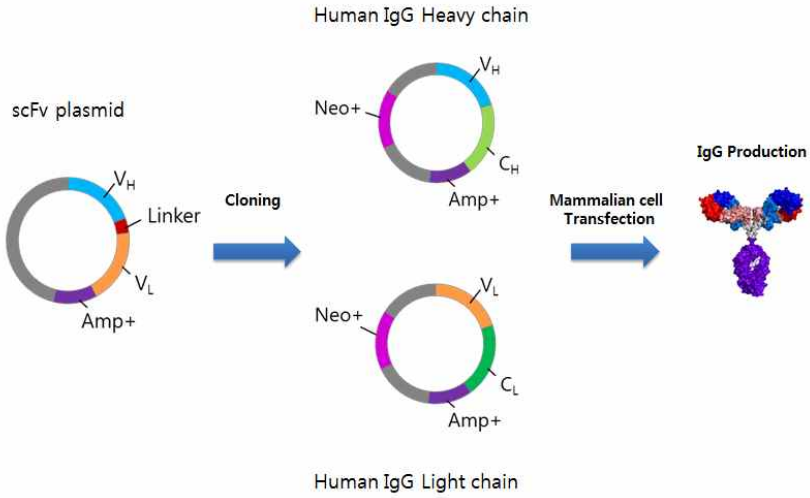


그림 17. 단일사슬항체조각의 면역글로불린 전환 과정 모식도

4. 2차 단클론 항체(aflatoxin M_1, T-2 toxin, Zearalenone) 중 최적의 단클론 항체 선정

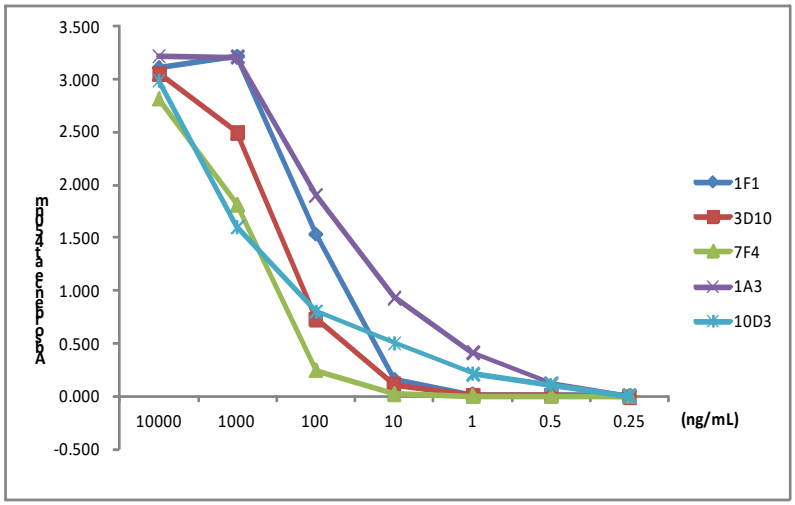
가. Aflatoxin M_1 단클론 항체 선정

(1) 복수 제작 및 정제: 5 hybridoma cells

- Hybridoma cell을 복강에 주입하기 5일전에 8주령의 male Balb/c mouse에 Pristane을 0.5mL씩 주입
- 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지에서 hybridoma cell을 배양함.
- cell을 모아 counting한 후 1,200rpm x 5min. 원심분리한 후 배지 상층액을 제거함.
- 마우스 당 1x 10^7 cell이 되게 PBS로 부유시켜 복강에 0.2mL을 주입함.
- 9-10일 후 복수가 차면 복수를 주사기를 이용하여 회수함.
- 복수를 2,500rpm x 10min. 원심분리 후 상층액을 protein G binding buffer로 5배 희석하여 0.2um syringe filter를 이용하여 여과함.
- 여과한 복수를 protein G bead에 loading한 후 binding buffer를 흘려 세척함.
- Elution buffer로 bead에 binding한 IgG를 모은 후, PBS로 버퍼 교환하여 -70℃에 보관하면서 다음 실험에 사용함.

(2) 항체 역가측정

- Carbonate buffer(pH9.6)에 Aflatoxin M_1-BSA conjugate를 1ug/mL되게 희석하여 ELISA plate well에 넣고 4℃에서 overnight coating 함.
- 세척액 PBST(PBS buffer+0.5% Tween20)로 3번 세척한 후, 정제한 항체를 10,000ng ~0.25ng/mL까지 PBS에 희석하여 coating한 plate에 100uL씩 넣고 37℃에서 1시간 반응시킴.
- 세척액으로 3번 세척한 후, goat anti-mouse IgG-HRP conjugate를 넣고 37℃에서 1시간 반응시킴.
- 세척액으로 5번 세척한 후, TMB solution을 넣고 20분 반응시킴.
- Stop solution을 넣고 450nm에서 흡광도를 측정함.
- 5개의 hybridoma cell 중 1A3이 동일 항체량을 사용했을 때 역가가 가장 높은 것으로 확인됨.


3.500
3.000
2.500
2.000
1.500
1.000
0.500
0.000
-0.500
10000
1000
100
10
1
0.5
0.25
(ng/mL)
1F1
3D10
7F4
1A3
10D3

나. T-2 mycotocxin 단클론 항체 선정

(1) 복수 제작 및 정제: 3 hybridoma cells

: Aflatoxin M_1과 같은 방법으로 cell 배양, 복수제작 및 정제 실시함.

(2) 항체 역가측정

- Carbonate buffer(pH9.6)에 T-2-BSA conjugate를 1ug/mL되게 희석하여 ELISA plate well 넣고 4℃에서 overnight coating 함.
- 세척액 PBST(PBS buffer+0.5% Tween20)로 3번 세척한 후, 정제한 항체를 10,000ng ~0.25ng/mL까지 PBS에 희석하여 coating한 plate에 100uL씩 넣고 37℃에서 1시간 반응시킴.
- 세척액으로 3번 세척한 후, goat anti-mouse IgG-HRP conjugate를 넣고 37℃에서 1시간 반응시킴.
- 세척액으로 5번 세척한 후, TMB solution을 넣고 20분 반응시킴.
- Stop solution을 넣고 450nm에서 흡광도를 측정함.
- 3개의 hybridoma cell 중 8F11 clone이 동일 항체량을 사용했을 때 역가가 더 높은 것으로 확인됨.

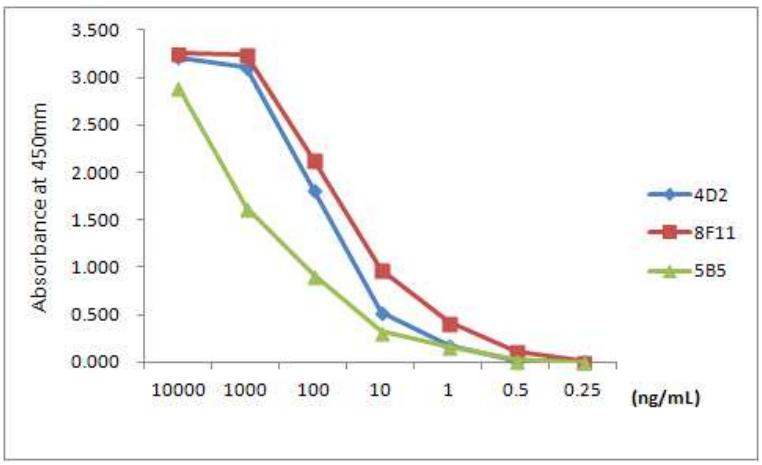


그림 20. Titration of 3 kinds MAb against T-2 toxin by ELISA

(3) T-2 toxin 항체의 교차반응 확인

- 8F11 clone의 교차반응을 확인하기 위해서 T_2-BSA conjugate를 1ug/mL되게 carbonate buffer에 희석하여 4℃에서 overnight coating 함.
- Conjugate가 coating된 plate를 3번 세척한 후, 정제한 monoclonal antibody 8F11 clone의 T-2 항체를 100ng/mL로 희석하여 각 well에 Aflatoxin B_1, DON, Ochratoxin A 그리고 Aflatoxin G_1 독신의 1, 10, 100, 1,000 ng/mL과 함께 넣고 1시간 반응시킴.
- 반응이 완료되면 3번 세척 후 goat anti-mouse IgG-HRP(5,000배 희석)넣고 37℃에서 1시간 반응시킴.
- 세척액으로 5번 세척한 후, TMB solution을 넣고 20분 반응시킴.
- Stop solution을 넣고 450nm에서 흡광도를 측정함.
- 8F11 hybridoma cell은 DON 독신의 저농도와 고농도에서 반응성이 높고 Aflatoxin B_1, G_1, deoxynivalenol(DON) 독신에 대해 교차반응성이 낮은 것으로 확인됨.

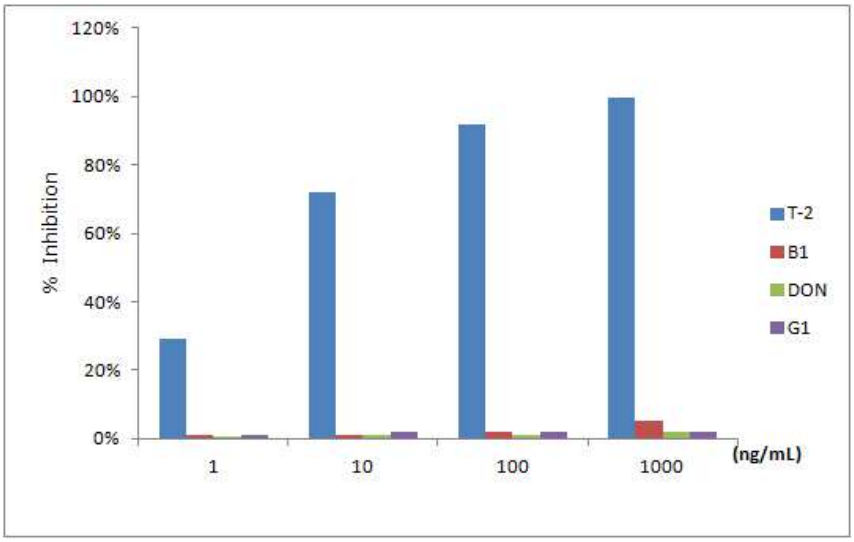


그림 21. Cross-reactivity of anti-T2 8F11 clone

다. Zearalenone 단클론 항체 선정

(1) 복수 제작 및 정제: 3 hybridoma cells

: Aflatoxin M_1과 같은 방법으로 cell 배양, 복수제작 및 정제 실시함.

(2) 항체 역가측정

- Carbonate buffer(pH9.6)에 zearalenone-BSA conjugate를 1ug/mL되게 희석하여 ELISA plate well 넣고 4℃에서 overnight coating 함.
- 세척액 PBST(PBS buffer+0.5% Tween20)로 3번 세척한 후, 정제한 항체를 10,000ng ~0.25ng/mL까지 PBS에 희석하여 coating한 plate에 100uL씩 넣고 37℃에서 1시간 반응시킴.
- 세척액으로 3번 세척한 후, goat anti-mouse IgG-HRP conjugate를 넣고 37℃에서 1시간 반응시킴.
- 세척액으로 5번 세척한 후, TMB solution을 넣고 20분 반응시킴.
- Stop solution을 넣고 450nm에서 흡광도를 측정함.
- 3개의 hybridoma cell 중 5D3 clone이 동일 항체량을 사용했을 때 역가가 더 높은 것으로 확인됨.

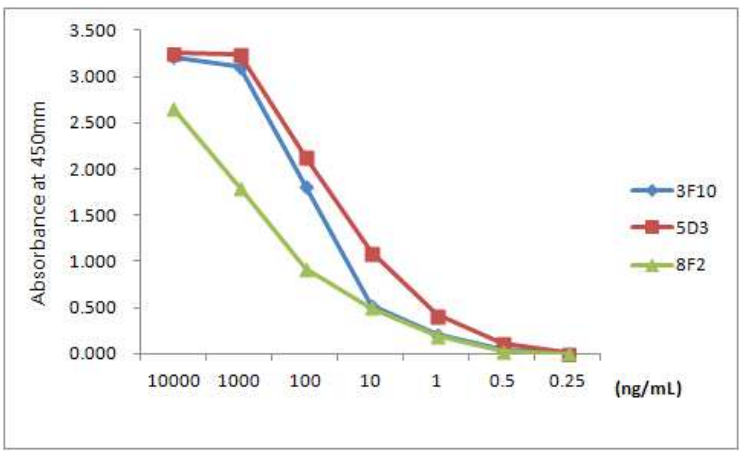


그림 22. Titration of 3 kinds MAb against zearalenone by ELISA

(3) Zearalenone 항체의 교차반응 확인

- 5D3 clone zearalenone 특이적 항체의 교차반응을 확인하기 위해서 zearalenone-BSA conjugate를 1ug/mL되게 carbonate buffer에 희석하여 4℃에서 overnight coating 함.
- Conjugate가 coating된 plate를 3번 세척한 후, 정제한 monoclonal anti-zearalenone 항체를 100ng/mL로 희석하여 각 well에 Zearalenone, Ochratoxin A, Aflatoxin B_1 그리고 G_1 톡신의 1, 10, 100, 1000 ng/mL과 함께 넣고 1시간 반응시킴.
- 반응이 완료되면 3번 세척 후 goat anti-mouse IgG-HRP(5,000배 희석)넣고 37℃에서 1시간 반응시킴.
- 세척액으로 5번 세척한 후, TMB solution을 넣고 20분 반응시킴.
- Stop solution을 넣고 450nm에서 흡광도를 측정함.
- 5D3 hybridoma cell의 항체는 다른 톡신에는 거의 교차반응이 없고 zearalenone의 저농도와 고농도에서 반응성이 높은 것으로 확인됨.

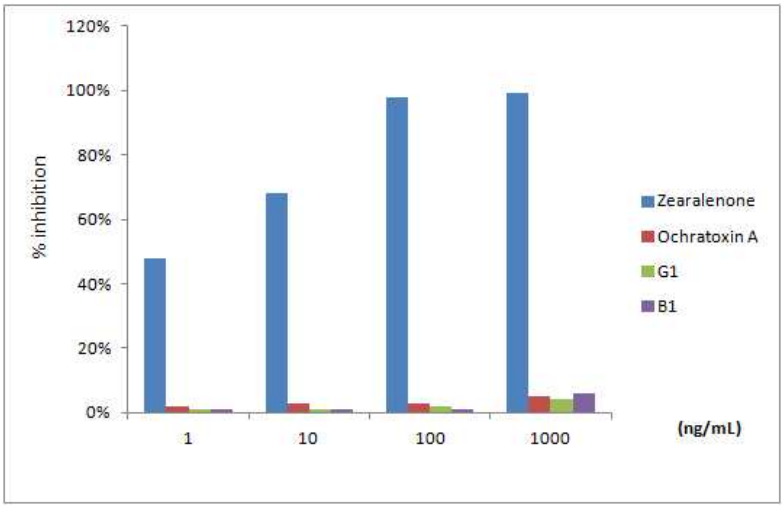


그림 23. Cross-reactivity of anti-Zearalenone 5D3 clone

5. Immuno-PCR 개발을 위한 특이 Biotinylated reporter DNA 합성 및 antibody-streptavidin 결합물 생성

가. Each mycotoxin antibody specific biotinylated reporter dsDNA 생성 시스템 확립

- 본 과제의 목표는 최종 6가지의 mycotoxin을 single 또는 multiple immuno-PCR 통해 검출할 수 있는 실험방법의 개발이다. 그러므로 toxin 마다 각각의 specific DNA sequence 합성 및 biotinylation을 수행할 경우 모두 개별적으로 조건의 최적화가 필요하고, 또한 사용된 DNA sequence에 따라 그 효율의 variation이 생길 것으로 생각 되어졌다. 이를 극복하기 위해, 동일 biotinylated DNA backbone을 사용하여 biotinylation의 효율을 일정하게 유지하면서 target에 따라 probing DNA sequence를 달리하여 각각의 특이 mycotoxin을 detection할 수 있는 system을 아래와 같이 개발하였다.

(1) Cloning plasmid의 multi-cloning sites를 이용한 mycotoxin detection antibody

specific probing DNA 생성을 위한 DNA backbone designing.

(가) Pet30a plasmid multi-cloning sites를 이용하여 아래 그림 18과 같이 디자인하였음.

(나) Biotinylation을 위한 primer sequences

F1: 5`- Biotin - CTTTGTTAGCAGCCGGATCTC –3`

F2: 5`- Biotin – AAAACCCCTCAAGACCCGTT –3`

R1: 5`- GCTAAATTCGAACGCCAGCA -3`

(다) F1-R1과 F2-R2 primer set은 각기 161bp, 250bp를 생성하고 MCS1과 MCS2 및 restriction site를 포함하게 디자인되었음.

(라) 이는 각기 다른 mycotoxin detection에 있어 동일 biotinylation과정을 수행할 수 있어 immuno-PCR 개발 시 효율을 일정하게 유지 시킬 수 있게 함.

(마) 또한 PCR amplicon이 포함하고 있는 MCS1과 MCS2 부위에 동물과 세균 등의 cDNA를 각기 클로닝하여 삽입함으로써 자연계에 존재하지 않은 특징적인 target probe를 생성함으로써 교차반응을 억제할 수 있는 특이적인 DNA 시퀀스를 제작하여 각각의 mycotoxin 특이적인 immuno-PCR 수행이 가능함.

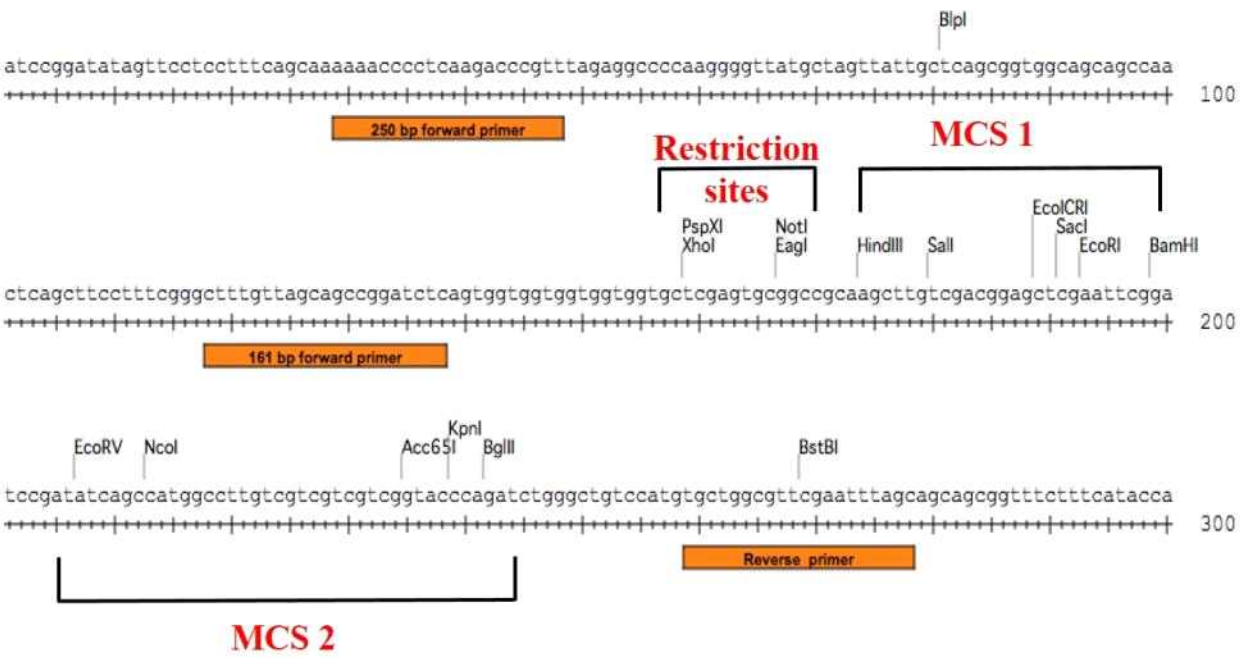


그림 24. 특이적인 mycotoxin detection을 위한 probe 생성 시스템. 동일한 forward and reverse primers를 이용하여 동일한 biotinylation 방법의 적용이 가능하도록 디자인 된 그림을 보여주고 있다. Forward primer는 biotin이 attach 된 형태로 제작하여 PCR 수행 시 자동적으로 biotinylation된 PCR product를 생산하게 된다. PCR amplicon에는 두 군데의 multi-cloning sites (MCS1, MCS2)를 삽입하여 각각의 mycotoxin마다 특이 적인 detection probe를 제작할 수 있게 하였고, restriction sites는 ELISA 반응 후 restriction enzyme을 이용하여 PCR template을 elution 하여 real-time PCR 반응에 사용할 수 있도록 하였다.

(2) Biotinylated reporter dsDNA 합성

◦ 5`- Biotin - CTTTGTTAGCAGCCGGATCTC -3` 와 5`-GCTAAATTCGAACGCCAGCA -3` primer를 사용하여 정제된 Pet30a plasmid를 template으로 사용하여 아래 조건과 같이 PCR을 진행하였음.
PCR condition : 95˚C/5min, 40 cycycle (95˚C1min, 53˚C/1min, 72˚C/2min), 72˚C/7min

◦ Gel electrophoresis를 통해 160bp의 PCR 산물을 확인 후, PCR purification kit (Quiagen)을 이용하여 biotinylation된 PCR product를 정제하여 다음 실험에 사용함.

◦ Gel electrophoresis를 통해 161, 250 bp의 biotin tagged PCR product (그림 25)를 확인 후, PCR purification kit (Quiagen)을 이용하여 biotinylation된 PCR product를 정제하여 다음 실험에 사용하였다. 1차적으로 161 bp biotinylated PCR product를 이용하여 추후 실험을 진행하였다.

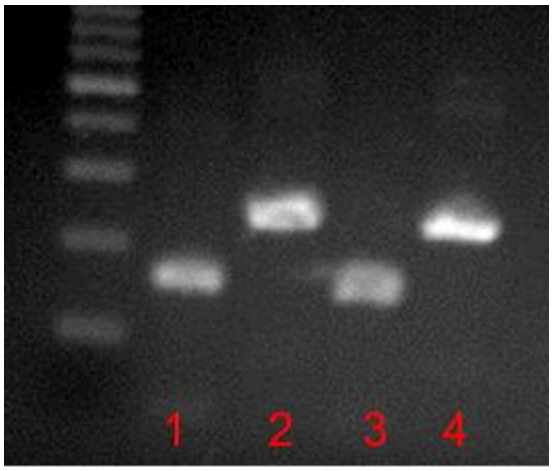


그림 25. Biotinylated double strand reporter DNA 생성. Biotin tagged forward primer를 사용하여 PCR template으로부터 직접적으로 증폭시켜 분리 사용하였다. Lane 1 and 2, 일반 primer sets을 사용하여 생산된 161, 250 bp PCR products. Lanes 3 and 4, 5‘ biotin tagged primers를 사용하여 생산된 biotinylated double strand PCR products.

(3) Streptavidin-antibody 결합물 생성

◦ Conjugation of antibody with streptavidin은 Kwon et al., (2014, Journal of food safety)의 방법을 따라서 진행하였고, Lightning-Link Streptavidin Conjugation Kit (Innova Biosciences Ltd., Cambridge, U.K.)를 이용하여 아래와 같이 매뉴얼에 따라 각각의 항체에 대하여 합성하였다. 모든 항체는 실험전 1mg/ml 농도로 희석하여 사용하였다.

1. Before you add antibody to the Lightning-Link® mix, add 1µl of LL-Modifier reagent for each 10µl of antibody to be labeled. Mix gently.
2. Remove the screw cap from the vial of Lightning-Link® mix and pipette the antibody sample (with added LL-modifier) directly onto the lyophilized material. Resuspend gently by withdrawing and re-dispensing the liquid

once or twice using a pipette.

3. Place the cap back on the vial and leave the vial standing for 3 hours at room temperature (20-25°C). Alternatively, and sometimes more conveniently, conjugations can be set up and left at room temperature overnight, as the longer incubation time has no negative effect on the conjugate.
4. After incubating for 3 hours (or more), add 1µl of LL-quencher reagent for every 10µl of antibody used. The conjugate can be used after 30 minutes.

위와 같이 합성된 Streptavidin-antibody 결합물은 4도씨에 보관하여 필요 시 사용하였다. Scale-up 필요시, 모든 시약을 조성 비율에 따라 증가시켜 합성하였다.

(4) 최적의 Streptavidin-antibody-biotinylated reporter dsDNA 생성 조건 확립

◦ Immuno-PCR 개발을 위하여 최적의 Capture antibody-reporter dsDNA 결합 조건을 확인하기 위하여, 다양한 농도의 streptavidin-capture antibody와 biotinylated reporter DNA를 (1:0.5, 1:1, 1:2, 1:4, 1:4, Volume 기준) 준비하여 실온에서 30분 간 반응 시켰다.

◦ 반응 후, streptavidin tagged anti-mycotoxin antibody를 protein G coated magnetic bead (PureProteome™ protein G-coated magnetic beads, Merck Millipore Corporation)를 이용하여 정제하고, unbound reporter DNA를 제거하였다. PBS 2번 wash 후 nuclease free water로 최종 2 번 더 wash 하였다.

◦ Nuclease free water를 모두 제거 한 뒤, 25 ul 의 restriction buffer (containing 1 U of Xho I, 그림 24 참조) tube에 넣은 뒤 15분 동안 반응시켜 reporter DNA를 분리시켰다.

◦ Magnetic retention을 이용하여 bead free supernatant containing reporter DNA를 얻은 후 아래와 같이 real-time PCR에 이용하였다.

◦ 2X SYBR master mix (Life technologies)를 이용하여 1000배 희석된 5 ul의 template 포함하여 total 20 ul 의 reaction mixture를 준비하여 real-time PCR을 진행하였고, 각 각의 조건에서 얻어진 reporter DNA의 반응의 Ct를 비교하여 아래 그림 10과 같이 각각의 항체에 대하여 가장 낮은 Ct 결과를 보여 주는 조건을 최종 선정하여 조건을 확립하였다. 실험결과 Aflatoxin M_1을 포함한 5가지 mycotoxin 항체의 경우 항체와 reporter DNA의 비율이 1:1일 때 최적의 결과가 나타났으며, Zearalenone 항체의 경우 1:2에서 최적의 결과를 도출하였다(그림 26, 27).

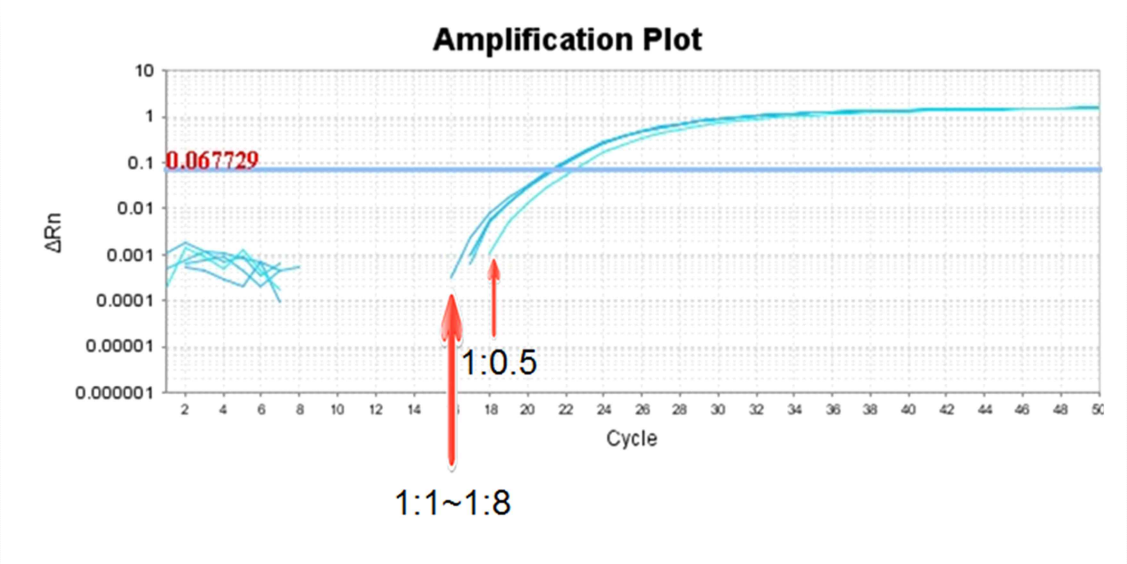


그림 26. Streptavidin-capture antibody와 biotinylated reporter DNA 결합을 위한 최적의 조건 설정. Streptavidin과 Aflatoxin M_1에 특이적인 항체 결합물과 biotinylated reporter DNA용액을 1:0.5, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8의 비율로 반응시켜 결합된 reporter DNA의 양을 real-time PCR로 측정하였다. 1:0.5보다 1:1의 비율에서 더 낮은 Ct를 형성하였고, reporter DNA의 양을 증가하였으나 더 이상의 Ct의 감소는 확인되지 않았다. 따라서 항체와 reporter DNA 용액을 1:1로 섞었을 때 항체에 결합하는 DNA의 양이 포화되었음을 알 수 있다. Zearalenone을 제외한 다른 항체에 대하여서도 동일한 방법으로 최적의 결합조건을 선정하였다.

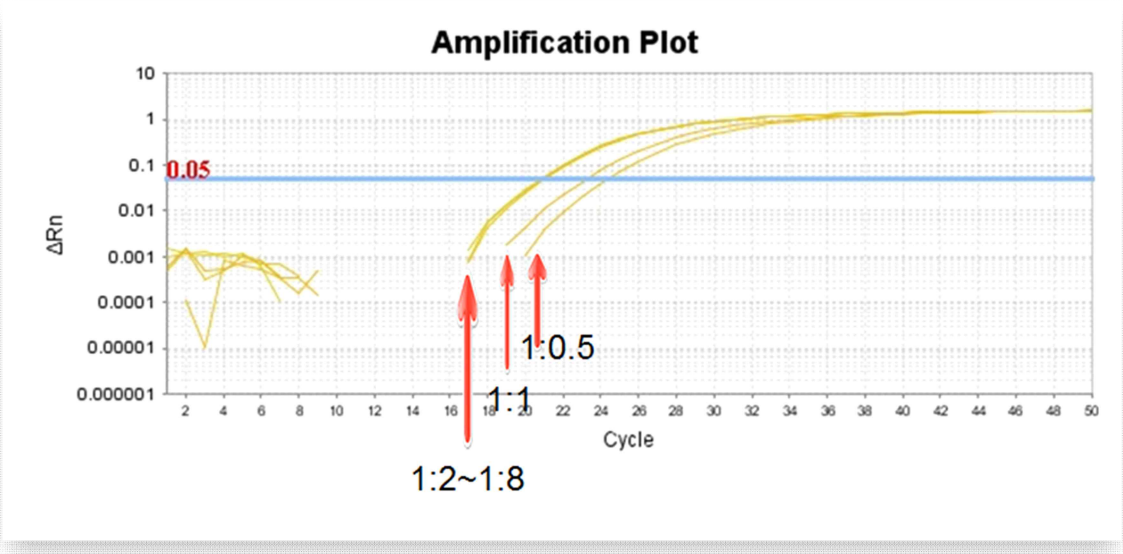


그림 27. Streptavidin-capture antibody와 biotinylated reporter DNA 결합을 위한 최적의 조건 설정. Streptavidin과 Zearalenone에 특이적인 항체 결합물과 biotinylated

reporter DNA용액을 1:0.5, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8의 비율로 반응시켜 결합된 reporter DNA의 양을 real-time PCR로 측정하였다. 1:0.5 과 1:1의 비율보다 1:2의 비율에서 더 낮은 Ct를 형성하였고, reporter DNA의 추가적인 양의 증가에 따른 더 이상의 Ct 감소는 확인되지 않았다. 따라서 항체와 reporter DNA 용액을 1:2로 섞었을 때 항체에 결합하는 DNA의 양이 포화되었음을 알 수 있다.

6. Mycotoxin 진단을 위한 Immuno-PCR법 개발 및 Evaluation

가. Real Time PCR Standard curve 생성

- 상용화 되어 판매되고 있는 Aflatoxin B_1, Deoxynivalenol, Ochratoxin A, Aflatoxin M_1, T-2 mycotoxin, Zearalenone 각각의 표준원액을 사용하여 PBS에 10^5pg/ml, 10^4pg/ml, 10^3pg/ml 10^2pg/ml, 10pg/ml로 준비하여 플레이트에 100ul 씩 Immuno-PCR plate에 incubation한 후 최종 Elution 용액을 이용하여 아래와 같이 Standard curve를 그렸다. Real-Time PCR 수행에 있어 각 샘플을 duplicate 하여 진행하였고, 다른 mycotoxin 결과에 비해 Ochratoxin A의 경우 상대적으로 동일 농도에서 Ct의 값이 높게 나타났으며, 10pg/ml의 표준 용액의 경우 duplicate 한 시료의 Ct 간 오차가 크게 나타났다(그림 28, 29, 30). 따라서 Ochratoxin A Immuno-PCR의 경우 상대적으로 민감도가 떨어질 것으로 예상되어 짐.

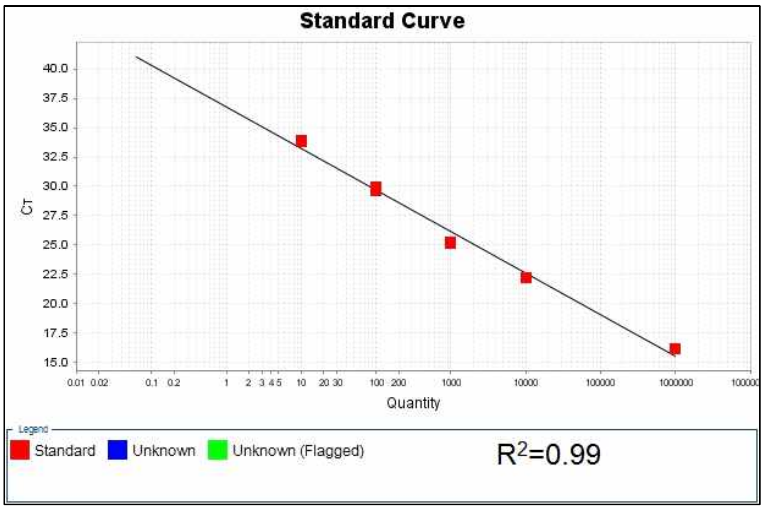


그림 28. Aflatoxin B_1 Immuno-PCR kit standard curve. Aflatoxin B_1을 10^5pg/ml부터 10^1pg/ml까지 PBS로 희석한 표준용액을 사용하여 수행하였음.

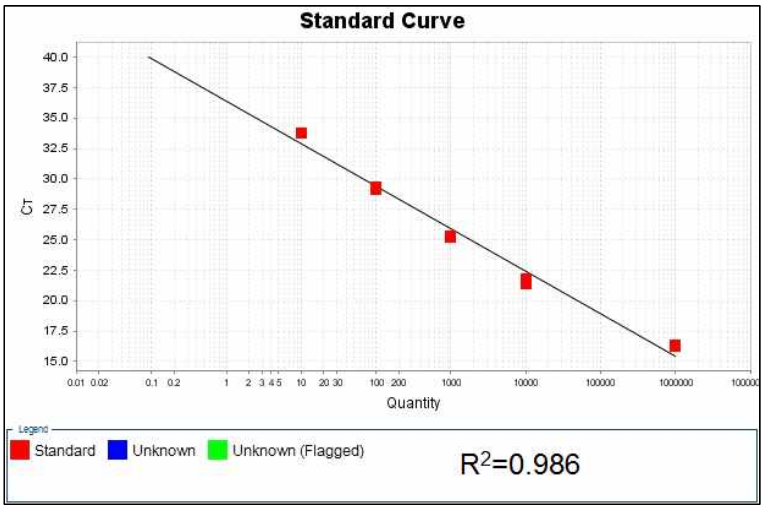


그림 29. Deoxynivalenol Immuno-PCR kit standard curve. Deoxynivalenol을 10^5pg/ml부터 10^1pg/ml까지 PBS로 희석한 표준용액을 사용하여 수행하였음. 다른 mycotoxin들도 유사한 결과를 나타냄.

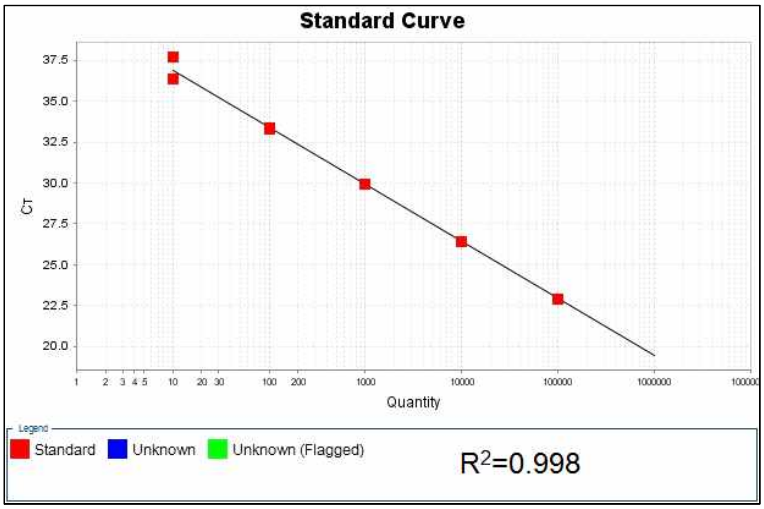


그림 30. Ochratoxin A Immuno-PCR kit standard curve. Ochratoxin A을 10^5pg/ml부터 10^1pg/ml까지 PBS로 희석한 표준용액을 사용하여 수행하였음.

2. Real Time PCR 양성 Ct value 확인

- Immuno-PCR kit를 사용하여 수행된 Standard curve 그리기에서 모든 키트가 최소 10 pg/ml 농도의 곰팡이 독소를 검출할 수 있음을 확인하였다. 따라서 표준용액을 1 pg/ml부터 20 pg/ml 사이의 다양한 농도로 준비하여 반응 후 real time PCR을 수행하여 이러한 농도의 양성 샘플로부터 다양한 Ct value를 확인하여 양성으로 판정할 수 있는 Ct의 cut off point를 확인하였다. 반응액에는 음성샘플을 포함하였으며, 그 결과는 아래와 같다 (그림 31, 32, 33). Aflatoxin B_1, Deoxynivalenol을 포함한 대부분의 경우 비교적 낮은 농도에서도(1pg/ml) 일부 양성 반응을 보였으며, 이 경우 Ct 값이 36~37로 나타났다. 그에 반해 Ochratoxin A의 경우 10pm/ml 농도에서 PCR 증폭이 일어났으나, 그보다 낮은 농도에서는 양성반응을 보이지 않았으며, 이 때 Ct는 37 이상이었다. 따라서 Ochratoxin A

kit는 상대적으로 민감도가 낮을 것으로 예상되며, 반응성이 높은 새로운 항체가 필요할 것으로 예상된다.

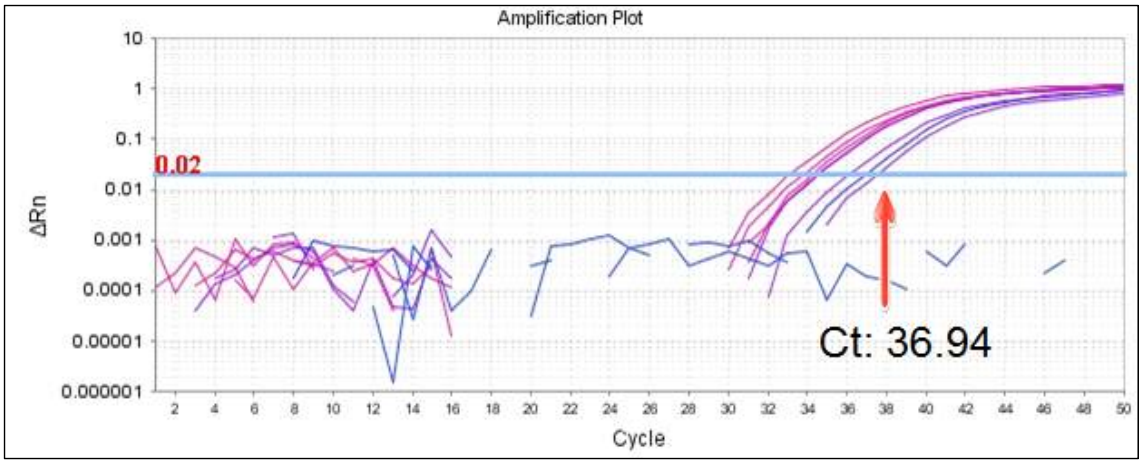


그림 31. Aflatoxin B_1 Immuno-PCR Ct value 확인

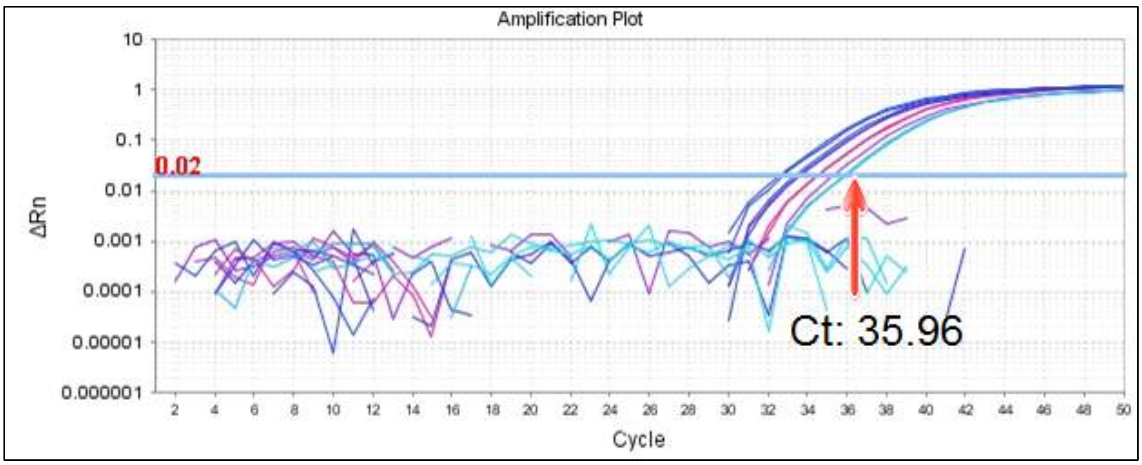


그림 32. Deoxynivalenol Immuno-PCR Ct value 확인

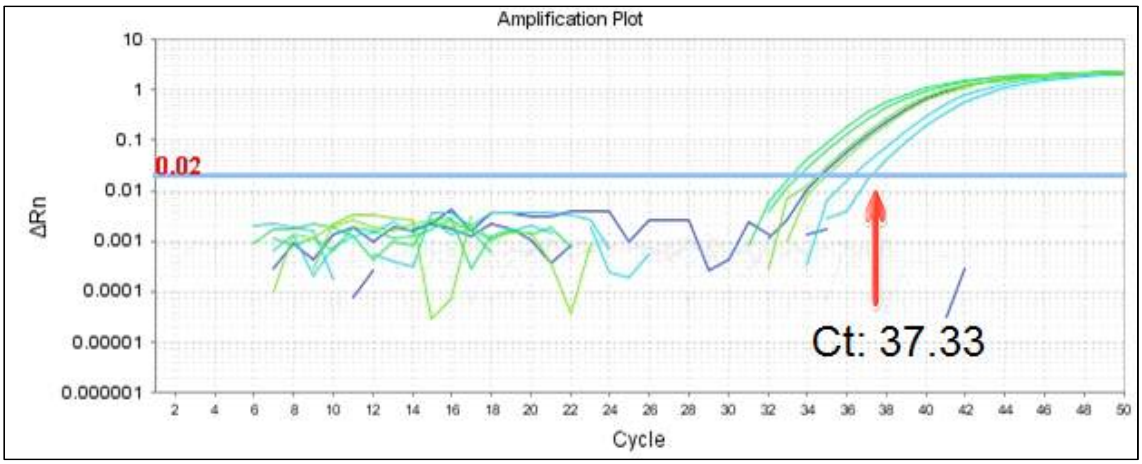


그림 33. Ochratoxin A Immuno-PCR Ct value 확인

제 2절 Mycotoxin 정량분석 kit의 개발

1. Capture antibody 흡착플레이트 제작

가. Aflatoxin B_1 항체 흡착플레이트 제작

(1) Coating buffer 조건확립

: Microplate에 최적의 항체코팅을 위한 코팅버퍼를 결정하기 위해서 일반적으로 많이 사용되는 3가지 버퍼에서의 최적 버퍼를 확인함.

- Aflatoxin B_1 항체를 50mM carbonate buffer(pH9.6), 25mM TBS(pH7.4) 그리고 20mM Tris-HCl(pH7.4)에 10ug/ml 되게 희석하여 4℃에서 overnight 반응시킴.
- 3번 세척한 후, 1,000, 100, 10, 1, 0 ng/mL의 Aflatoxin B_1과 Aflatoxin B_1-HRP conjugate를 넣고 37℃에서 1시간 반응시킴.
- 5번 세척 후 TMB substrate를 넣고 20분 반응시킴.
- Stop solution 넣고 반응 정지시킨 후, 450nm에서 흡광도 측정함.
- 50mM carbonate buffer에서 저농도와 고농도 Aflatoxin B1과의 반응성이 뛰어난 것으로 확인됨.

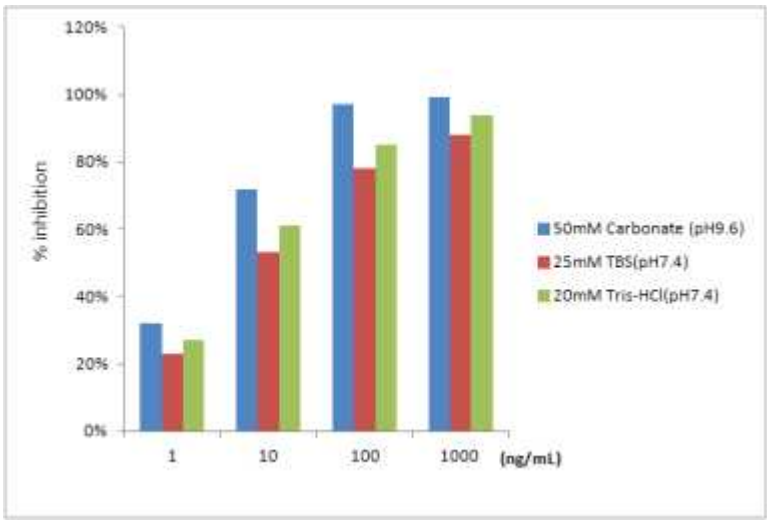


그림 34. Optimization of coating buffer condition for aflatoxin B_1 antibody

(2) Coating 항체 농도 결정

- Microplate에 코팅하는 최적 항체량을 결정하기 위해 50mM carbonate coating buffer(pH9.6)에 항체를 10, 1, 0.5, 0.1ug/mL 농도로 희석하여 4℃에서 overnight 반응시킴.
- 3번 세척한 후, Aflatoxin B1 1, 10, 1,00, 1000 ng/mL 과 Aflatoxin B_1-HRP conjugate를 넣고 37℃에서 1시간 반응시킴.
- 5번 세척 후, TMB substrate 넣고 20분 반응시킴.
- Stop solution 넣고 450nm에서 흡광도를 측정함.
- Aflatoxin B_1 항체 1,000ng/mL 코팅양이 가장 적합한 것으로 판단됨.

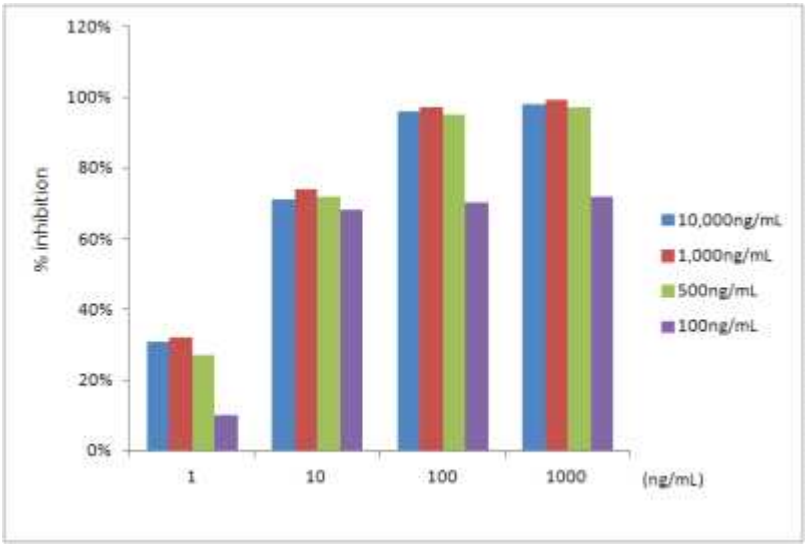


그림 35. Optimization of coating concentration for aflatoxin B_1 antibody

(3) Coating 조건 확립

: ELISA plate에 항체코팅을 위한 온도 및 시간의 최적조건 확립

- 1F1 clone의 Aflatoxin B_1 항체를 carbonate buffer(pH9.6)에 1,000ng/mL 되게 희석하여 4℃에서 1hr, 2hr 그리고 3hr 조건과 37℃에서 1hr, 2hr, 3hr 동안 반응시킴.
- 반응시간이 끝나면 3번 세척한 후, Aflatoxin B_1 톡신 1, 10, 100, 1,000ng/mL 농도를 Aflatoxin B_1-HRP conjugate와 함께 37℃에서 1시간 반응시킴.
- 반응완료 후, 5번 세척 후, TMB substrate를 넣고 20분 반응시킴.
- Stop solution을 넣고 450nm에서 흡광도를 측정하여 Inhibition percentage(%)를 계산함.
- 37℃에서 2시간 코팅조건에서 최적의 결과를 얻었음.

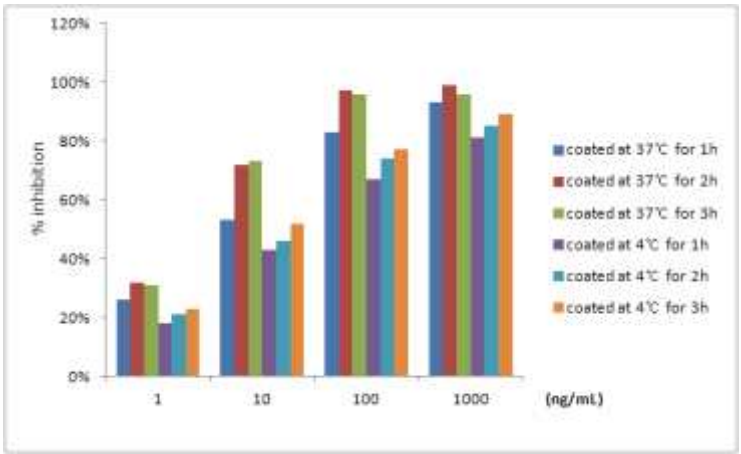


그림 36. Optimization of coating condition for aflatoxin B_1 antibody

나. Deoxynivalenol 항체 흡착플레이트 제작

(가) Coating buffer 조건확립

- Aflatoxin B_1 항체와 같이 50mM carbonate buffer(pH9.6), 25mM TBS(pH7.4) 그리고 20mM Tris-HCl(pH7.4)에 10ug/mL 농도의 deoxynivalenol 항체를 microplate에 넣고 4℃에서 overnight coating 시킴.

◦ 3번 세척한 후, 1,000, 100, 10, 1, 0 ng/mL의 deoxynivalenol과 deoxynivalenol-HRP conjugate를 넣고 37℃에서 1시간 반응시킴.
◦ 5번 세척 후 TMB substrate를 넣고 20분 반응시킴.
◦ Stop solution 넣고 반응 정지시킨 후, 450nm에서 흡광도 측정함.
◦ 50mM carbonate buffer에서 저농도와 고농도의 deoxynivalenol과의 반응성이 뛰어난 것으로 확인됨.

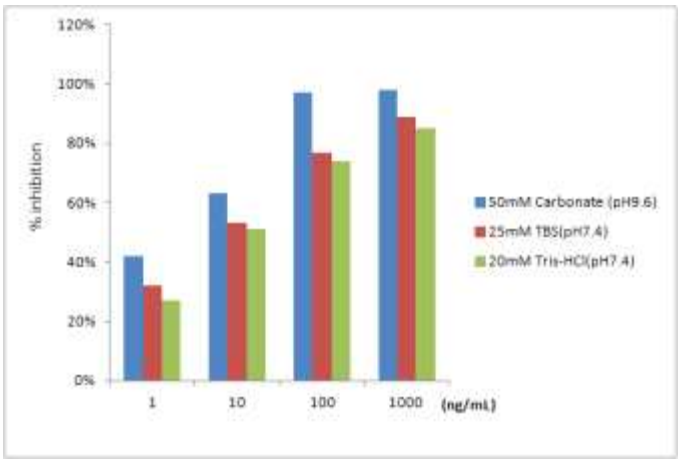


그림 37. Optimization of coating buffer condition for deoxynivalenol antibody

(2) Coating 항체 농도 결정

◦ Microplate에 코팅하는 최적 항체량을 결정하기 위해 50mM carbonate coating buffer(pH9.6)에 항체를 10, 1, 0.5, 0.1ug/mL 농도로 희석하여 4℃에서 overnight 반응시킴.
◦ 3번 세척한 후, deoxynivalenol 1, 10, 100, 1,000 ng/mL 과 deoxynivalenol-HRP conjugate를 넣고 37℃에서 1시간 반응시킴.
◦ 5번 세척 후, TMB substrate 넣고 20분 반응시킴.
◦ Stop solution 넣고 450nm에서 흡광도를 측정함.
◦ Deoxynivalenol 항체 1,000ng/mL 코팅양이 가장 적합한 것으로 판단됨.

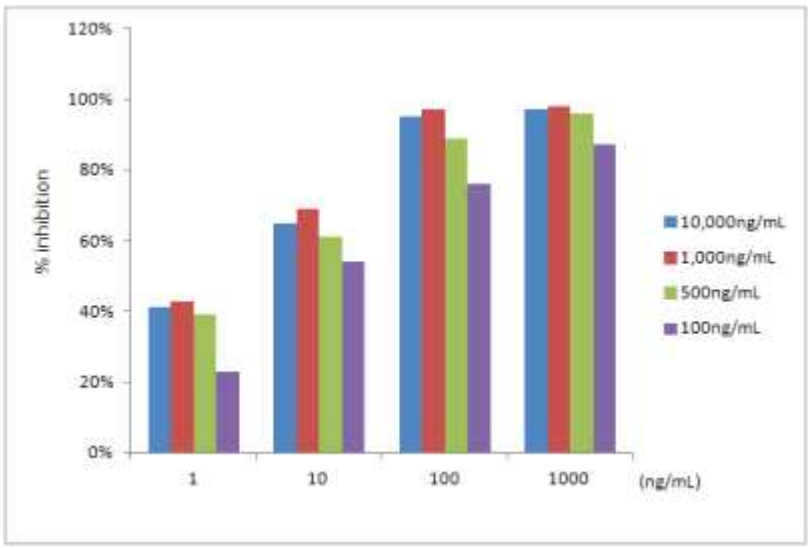


그림 38. Optimization of coating concentration for deoxynivalenol antibody

(3) Coating 조건 확립

: ELISA plate에 항체코팅을 위한 온도 및 시간의 최적조건 확립

- 6H2 clone의 deoxynivalenol 항체를 carbonate buffer(pH9.6)에 1,000ng/mL 되게 희석하여 4℃에서 1h, 2h 그리고 3h 조건과 37℃에서 1h, 2h 그리고 3h 동안 반응시킴.
- 반응시간이 끝나면 3번 세척한 후, deoxynivalenol 톡신 1, 10, 100, 1,000ng/mL 농도를 deoxynivalenol-HRP conjugate와 함께 37℃에서 1시간 반응시킴.
- 반응완료 후, 5번 세척 후, TMB substrate를 넣고 20분 반응시킴.
- Stop solution을 넣고 450nm에서 흡광도를 측정하여 Inhibition percentage(%)를 계산함.
- 37℃에서 2시간 코팅조건에서 최적의 결과를 얻었음.

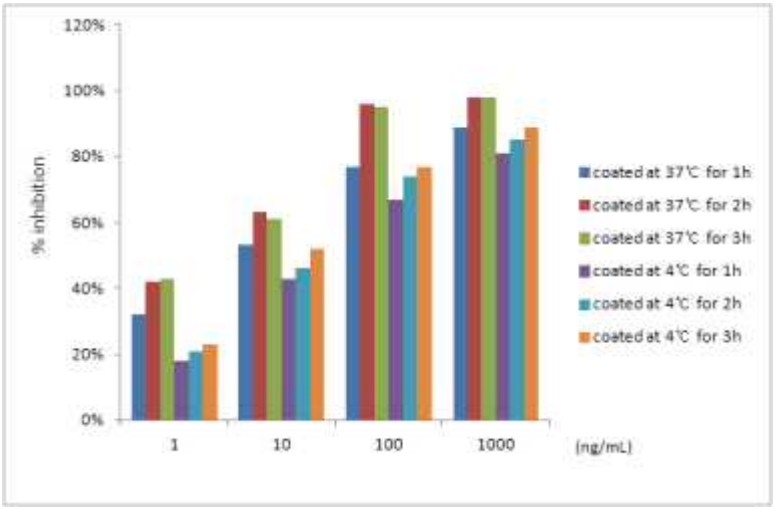


그림 39. Optimization of coating condition for deoxynivalenol antibody

다. Ochratoxin A 항체 흡착플레이트 제작

(1) Coating buffer 조건확립

- Aflatoxin B_1 항체와 같이 50mM carbonate buffer(pH9.6), 25mM TBS(pH7.4) 그리고 20mM Tris-HCl(pH7.4)에 10ug/mL 농도의 ochratoxin A 항체를 microplate에 넣고 4℃에서 overnight coating 시킴.
- 3번 세척한 후, 1,000, 100, 10, 1, 0 ng/mL의 ochratoxin A 와 ochratoxin A-HRP conjugate를 넣고 37℃에서 1시간 반응시킴.
- 5번 세척 후 TMB substrate를 넣고 20분 반응시킴.
- Stop solution 넣고 반응 정지시킨 후, 450nm에서 흡광도 측정함.
- 50mM carbonate buffer에서 저농도와 고농도의 ochratoxin A와의 반응성이 뛰어난 것으로 확인됨.

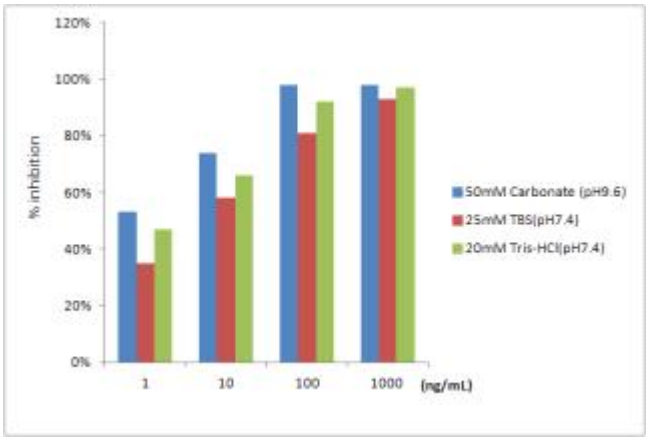


그림 40. Optimization of coating buffer condition for ochratoxin A antibody

(2) Coating 항체 농도 결정

- Microplate에 코팅하는 최적 항체량을 결정하기 위해 50mM carbonate coating buffer(pH9.6)에 항체를 10, 1, 0.5, 0.1ug/mL 농도로 희석하여 4℃에서 overnight 반응시킴.
- 3번 세척한 후, ochratoxin A를 1, 10, 100, 1,000ng/mL 과 ochratoxin A-HRP conjugate를 넣고 37℃에서 1시간 반응시킴.
- 5번 세척 후, TMB substrate 넣고 20분 반응시킴.
- Stop solution 넣고 450nm에서 흡광도를 측정함.
- Ocharatoxin A 항체를 생산하는 9C2 clone의 deoxynivalenol 항체 500ng/mL 코팅양이 가장 적합한 것으로 판단됨.

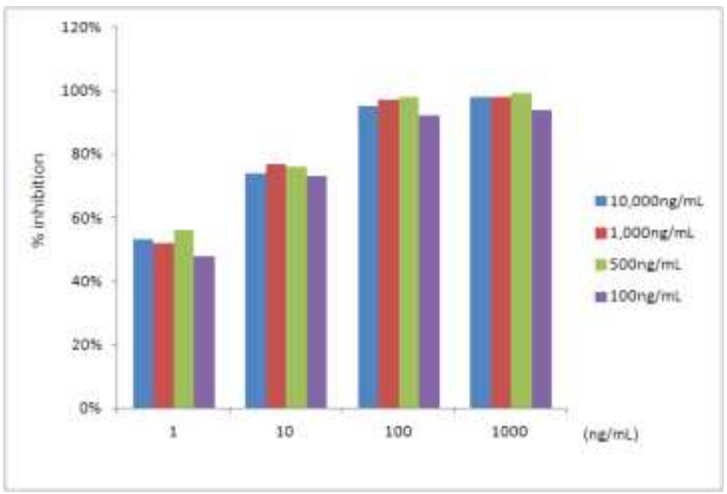


그림 41. Optimization of coating buffer condition for ochratoxin A antibody

(3) Coating 조건 확립

: ELISA plate에 항체코팅을 위한 온도 및 시간의 최적조건 확립

- 9C2 clone의 ochratoxin A 항체를 carbonate buffer(pH9.6)에 500ng/mL 되게 희석하여 4℃에서 1h, 2h 그리고 3h 조건과 37℃에서 1h, 2h 그리고 3h 동안 반응시킴.
- 반응시간이 끝나면 3번 세척한 후, ochratoxin A 톡신 1, 10, 100, 1,000ng/mL 농도를 ochratoxin A-HRP conjugate와 함께 37℃에서 1시간 반응시킴.

◦ 반응완료 후, 5번 세척 후, TMB substrate를 넣고 20분 반응시킴.
◦ Stop solution을 넣고 450nm에서 흡광도를 측정하여 Inhibition percentage(%)를 계산함.
◦ 37℃에서 2시간 코팅조건에서 최적의 결과를 얻었음.

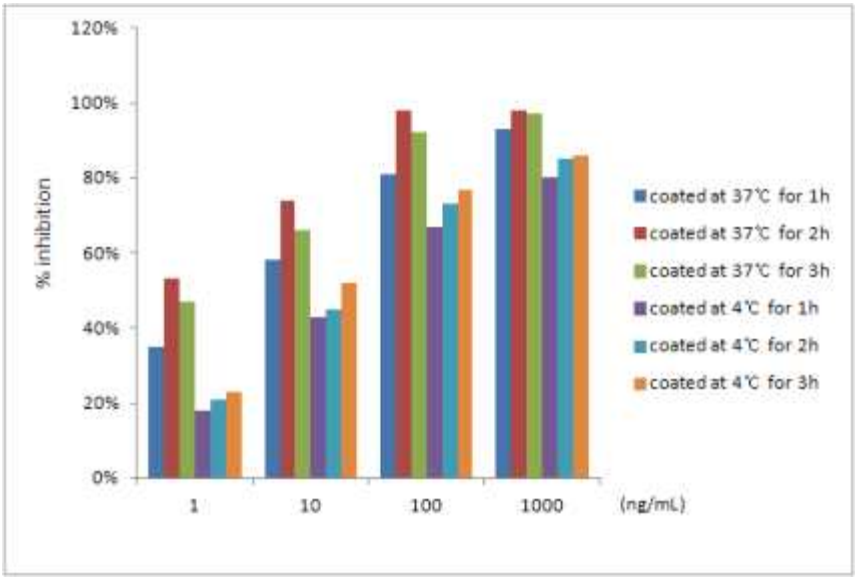


그림 42. Optimization of coating condition for ochratoxin A antibody

2. Detection antibody와 reporter DNA 고정화

가. Biotinylated-Reporter double strand DNA 제작

(1) Reporter DNA의 제작

◦ Reporter DNA의 서열은 아래와 같이 eukaryotic과 prokaryotic origin의 두개의 fragment를 연결한 구조를 가지게 하여 자연계에 존재하지 않는 인위적인 시퀀스를 디자인 함(참고 문헌: Journal of food safety (2014, 34(3):249-256) A Quantitative Real-Time Immuno-PCR Assay for Detection of Staphylococcus Aureus Enterotoxin H, 농림수산과학기술기획평가원 보고서 황색포도상균 장독소 정량키트개발, 한국소비자원, 2012))

-5'-TATCCAATCCATTCCAGGCCCTGTCCAGGCCTCTGTTTCACCCAGTTTATACCGTAGCTTGTGAATGTATATCCAGAAGCCTTGCAGGACATCTTCACTGAGGACAAGGGCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTT-3'.총 길이 246-bp

◦ Biotinylated Reporter DNA 효과적이고 지속적인 생산을 위하여 보고서 1절에서 개발된 pET30a backbone system을 이용하기 위해 위 reporter DNA sequence를 pET30a multicloning sites 중 Hind III와 Bgl II 위치에 directional cloning 함.

◦ 5`- Biotin - CTTTGTTAGCAGCCGGATCTC -3` 와 5`- GCTAAATTCGAACGCCAGCA -3` primer를 사용하여 cloning 된 pET30a plasmid를 template으로 사용하여 아래 조건과 같이 PCR을 진행하여 Biotinylated reporter DNA를 제작함.

PCR condition : 95℃/5min, 40 cycles (95℃1min, 53℃/1min, 72℃/2min), 72℃/7min

◦ 생산된 reporter DNA는 다양한 마이코톡신 검출에 공통적으로 사용되며, Reporter DNA detection primer는 forward primer 5'-AAGCCTTGCAGGACATCTTCA-3' 와 reverse primer 5'-GCCGCCAGTGTGAT GGATAT-3'이며 증폭 산물의 크기는 67 bp 임을 확인하였다.

나. Streptavidin-antibody 결합물 생성

(1) Streptavidin-antibody conjugation

◦ 정제된 각각의 항체를 antibody-streptavidin conjugation을 위해 Kwon et al., (2014, Journal of food safety)의 방법을 따라 Lightning-Link Streptavidin Conjugation Kit (Innova Biosciences Ltd., Cambridge, U.K.)를 이용하여 아래와 같이 매뉴얼에 따라 각각의 항체에 대하여 합성하였다. 모든 항체는 실험전 1mg/ml 농도로 희석하여 사용하였다.

1. Before you add antibody to the Lightning-Link® mix, add 1µl of LL-Modifier reagent for each 10µl of antibody to be labeled. Mix gently.
2. Remove the screw cap from the vial of Lightning-Link® mix and pipette the antibody sample (with added LL-modifier) directly onto the lyophilized material. Resuspend gently by withdrawing and re-dispensing the liquid once or twice using a pipette.
3. Place the cap back on the vial and leave the vial standing for 3 hours at room temperature (20-25ºC). Alternatively, and sometimes more conveniently, conjugations can be set up and left at room temperature overnight, as the longer incubation time has no negative effect on the conjugate.
4. After incubating for 3 hours (or more), add 1µl of LL-quencher reagent for every 10µl of antibody used. The conjugate can be used after 30 minutes.

(2) anti-Aflatoxin B_1 antibody 와 Streptavidin conjugate 확인 시험.

◦ 1ug/mL 농도의 Aflatoxin B_1-BSA conjugate를 microplate에 넣고 4℃에서 overnight 반응시킴.
◦ 3번 세척 후, anti-Aflatoxin B_1-streptavidin conjugate를 1, 10, 100, 1,000, 10,000ng/mL 농도로 희석하여 각 well에 넣고 37℃에서 1시간 반응시킴.
◦ 반응이 완료되면 3번 세척 후, anti-Streptavidin antibody (HRP)을 넣고 37℃에서 1시간 반응시킴.
◦ 5번 세척 후, TMB substrate 넣고 20분 반응시킴.
◦ Stop solution 넣고 450nm에서 흡광도 측정함.
◦ Aflatoxin antibody에 streptavidin coupling이 잘된 것으로 확인됨.

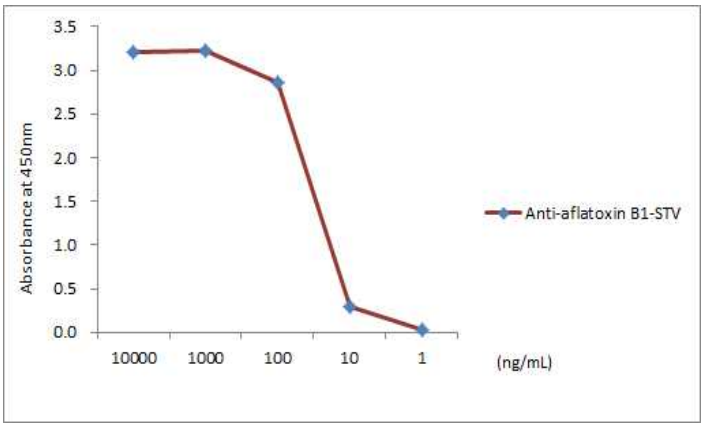


그림 43 Titration of anti-Aflatoxin B_1 and streptavidin conjugate

(3) anti-deoxylnivalenol antibody 와 Streptavidin conjugate 확인 시험.

- 1ug/mL 농도의 deoxynivalenol-BSA conjugate를 microplate에 넣고 4℃에서 overnight 반응시킴.
- 3번 세척 후, anti-deoxynivalenol-streptavidin conjugate를 1, 10, 100, 1,000, 10,000ng/mL 농도로 희석하여 각 well에 넣고 37℃에서 1시간 반응시킴.
- 반응이 완료되면 3번 세척 후, anti-Streptavidin antibody (HRP)를 넣고 37℃에서 1시간 반응시킴.
- 5번 세척 후, TMB substrate 넣고 20분 반응시킴.
- Stop solution 넣고 450nm에서 흡광도 측정함.
- anti-deoxynivalenol antibody와 streptavidin conjugation이 잘된 것으로 확인됨.

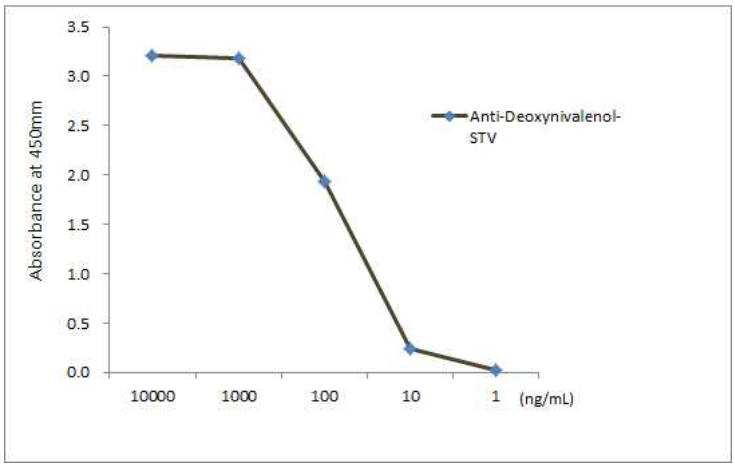


그림 44. Titration of anti-deoxynivalenol and streptavidin conjugate

(4) anti-ochratoxin A antibody와 Streptavidin conjugate 확인 시험.

- 1ug/mL 농도의 ochratoxin A-BSA conjugate를 microplate에 넣고 4℃에서 overnight 반응시킴.
- 3번 세척 후, anti-ochratoxin A-streptavidin conjugate를 1, 10, 100, 1,000, 10,000ng/mL 농도로 희석하여 각 well에 넣고 37℃에서 1시간 반응시킴.
- 반응이 완료되면 3번 세척 후, anti-Streptavidin antibody (HRP)을 넣고 37℃에서 1시간 반응

시킴.

- ○ 5번 세척 후, TMB substrate 넣고 20분 반응시킴.
- ○ Stop solution 넣고 450nm에서 흡광도 측정함.
- ○ anti-ochratoxin A의 streptavidin coupling이 잘된 것으로 확인할 수 있었음.

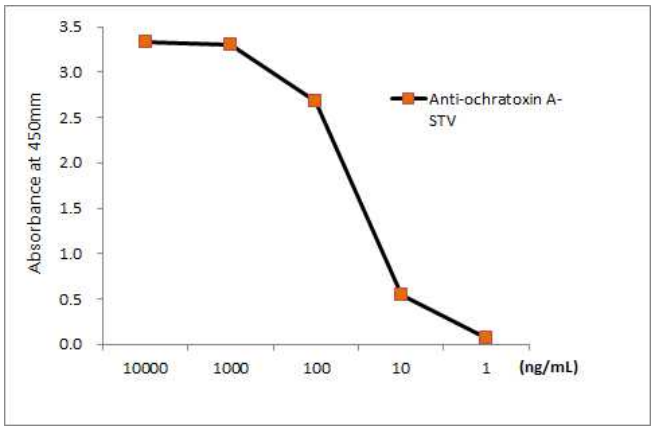


그림 45. Titration of anti-ochratoxin A and streptavidin conjugate

다. Antibody-reporter DNA 결합물 생성

○ Antibody-reporter DNA 결합은 제 1절의 실험결과와 같이 1:1의 결합비로 합성하여 사용하였다.

3. 1차 시제품 생산 (Aflatoxin B_1, Deoxynivalenol, Ochratoxin A)

가. 시제품 생산

(1) 구성 시약 제조

○ Antibody-reporter, washing buffer는 직접 제조하여 제공하고 나머지 필요시약은 주문생산 또는 구입 후, 분주하여 제공하는 것으로 하였음.

(2) Kit의 제조공정

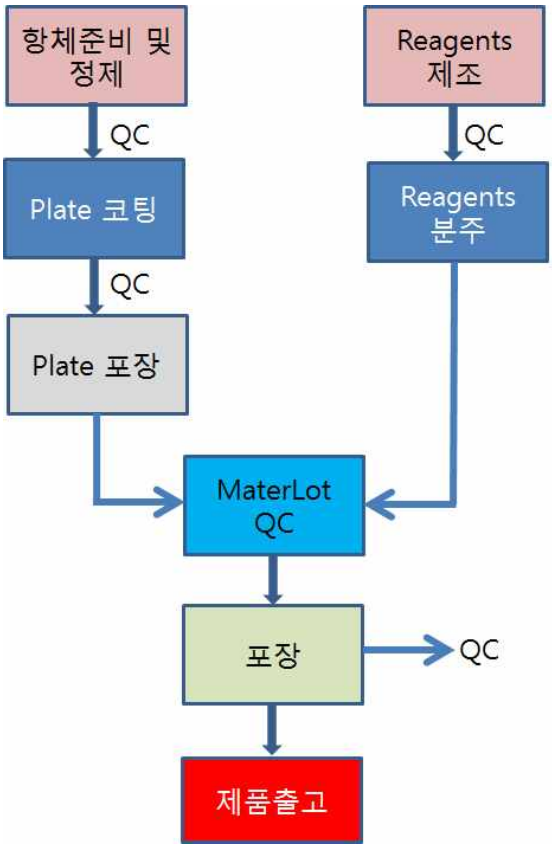


그림 46. Kit의 제조공정

(3) 대량생산을 위한 prototype의 시연 및 평가

- 제품 prototype

① Mycotoxin (Aflatoxin B_1, Ochratoxin A, Deoxynivalenol,) standard, 1μg/mL, 300μl

② Ab-STV-Biotin-reporter, 1mL

③ Washing buffer, 20X, 50mL

④ 10X Restriction enzyme buffer, 500μl

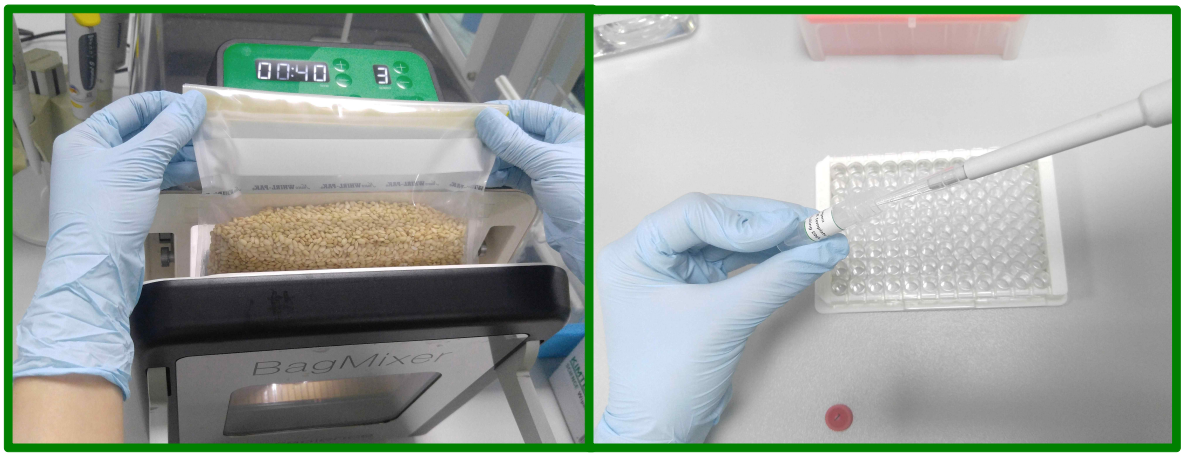
⑤ Restriction enzyme, 150μl

⑥ RT-PCR Premixture tube(8X12 strips=96 tubes)

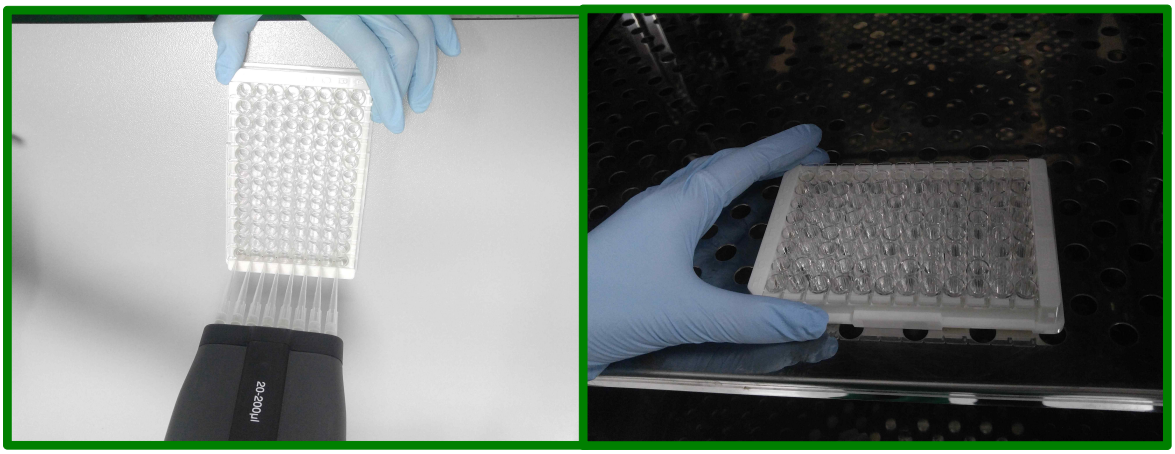
⑦ Immunoassay plate(12 strips, 8 well per strip)

- (4) 시연 과정

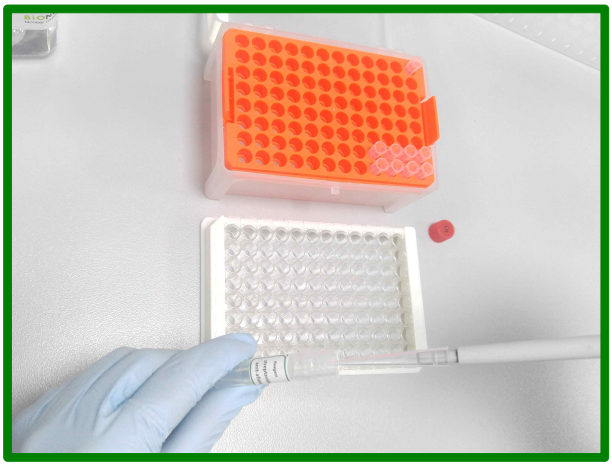
① stomaker를 이용한 샘플 준비 및 제공된 Mycotoxin(Aflatoxin B_1, Ochratoxin A, Deoxynivalenol) standard 준비하여 각 well에 넣고 37°C, 20분 반응시킨다.



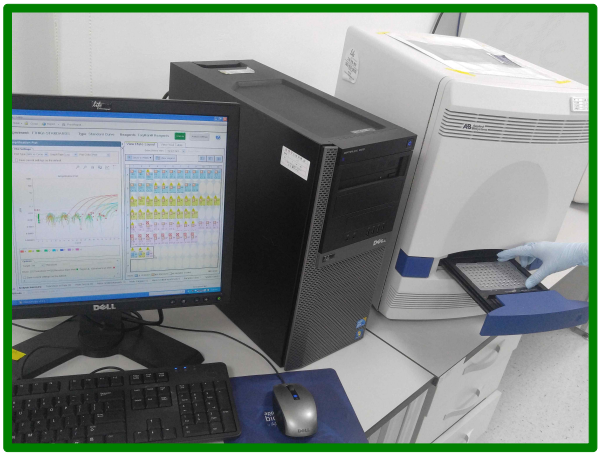
② 세척한 후, Ab-STV-Biotin-reporter DNA 희석액 넣고 37℃, 20분 반응시킨다.



③ Microplate shaker를 이용하여 세척한 후, Restriction enzyme 처리하여 37℃, 15분 반응시킨다.



④ Real time PCR 반응 후 결과를 분석한다.



(5) Kit의 prototype을 위한 protocol의 정립 및 시제품 생산

LIST OF COMPONENTS

① Mycotoxin (Aflatoxin B_1, Ochratoxin A, Deoxynivalenol,) standard, 1μg/mL, 300 μl
② Ab-STV-Biotin-reporter, 1mL
③ Washing buffer, 20X, 50mL
④ 10X Restriction enzyme buffer, 500μl
⑤ Restriction enzyme, 150μl
⑥ RT-PCR Premixture tube(8X12 strips=96 tubes)
⑦ Immunoassay plate(12 strips, 8 well per strip)

MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

. Stomaker
. Incubator

. Refrigerator
. Centrifuge
. Real-time PCR device and analysis software
. Micropipettor (s) and disposable pipette tips
. Multi-channel pipette capable of dispensing 50-100µl
. Solution reservoir (recommended)
. Microtiter plate washer (recommended)
. Orbital plate shaker capable of 300-500rpm (recommended)
. Well-closed containers (15ml tubes or more in capacity)

B. Performing Immuno-Assay

1. 샘플 준비: 고체 시료의 경우 5 g, 액체 시료의 경우 5 ml을 측정하여 45 ml의 DW (또는 75% Methanol)와 섞은 후 stomaker 등을 이용하여 진탕한 후 이 중에서 1 ml을 1200 rpm, 10 분간 centrifuge하여 상층액을 1.5 ml tube에 옮겨 놓고 4˚C에 보관합니다.
2. 샘플 well 준비 (Preparing the Sample Wells; Reagent ⑦): 포장을 뜯은 후 필요한 수만큼의 well 을 떼어냅니다. 이 때 각 샘플마다 2개의 well이 필요하며 한 회 실험당 control및 standard curve 작성을 위한 well 6개를 더 준비해 주십시오. 뜯어낸 well들을 holder에 끼워줍니다.
3. Standard 준비: 제공된 Mycotoxin standard(Reagent ①)를 10µl 취하여 PBS 90µl에 희석합니다. 이것을 기준으로 10배수씩 단계적으로 PBS에 희석한 것을 4개 더 만듭니다.
4. B-1과 B-3에서 준비한 샘플과 standard를 각 well에 100µl넣고 37˚C, 20분 반응시킵니다.
4. Well을 희석한 1X washing buffer(Reagent ③)로 세척합니다.
5. 1X로 희석한 Ab-STV-Biotin-reporter(Reagent ②)를 각 well에 100µl 분주 후 37˚C, 20분 반응시킵니다.
6. 반응액을 털어내고 1X wash buffer를 300µl/well 분주하여 1분간 vigorously shaking하여 세척합니다.
7. B-6과 같은 방법으로 4회 세척합니다.
8. 각 well에 10X Restriction enzyme buffer(Reagent ④) 2uL, Restriction enzyme(Reagent ⑤) 1uL, DW 17uL을 넣고 37˚C, 15분 반응시킵니다.
9. 상층액을 well당 5µl씩 따서 다음 과정의 template로 사용합니다.

C. real-time PCR

1. B-9에서 준비된 각각의 template 5µl를 RT-PCR Premixture(Reagent ⑥)

에 넣고 real-time PCR 준비를 합니다.

2. 다음 조건하에 real-time을 실시합니다. 95˚C, 10min → 40 cycles of 95˚C, 15sec and 62˚C, 1min

3. Threshold를 0.5로 설정하기를 권장하나 standard Mycotoxin well의 결과에 따라 소프트웨어 별로 권장하는 threshold가 다를 수 있습니다.

4. 5개의 Mycotoxin standard well에서 얻어진 Ct 값이 25 이하가 아니거나, PBS만을 넣은 negative control well에서 얻어진 Ct값이 30 이상이 아니면 잘못된 실험입니다.

5. 5개의 Mycotoxin standard well에서 얻어진 Ct 값을 이용하여 추세선을 작성하신 후, 2개의 sample well에서 얻어진 평균 Ct 값을 대입하셔서 샘플에서의 Mycotoxin 농도를 산출합니다. 이 두개의 Ct값 차이가 1 이상 나타나면 잘못된 실험입니다. 이때, 최초 희석 농도인 10배를 감안하여 최종 계산에 반영합니다.

그림 47. 완성된 시제품

(6) 시약의 안정성 평가

(가) 연구 방법

ㅇ 제작된 kit를 4℃, 25℃, 37℃ 3가지 온도에서 보관하였으며, 1주 간격으로 음성 검체를 이용하여 확인하였음.

(나) 연구 결과

ㅇ 본 키트의 경우 4℃, 25℃, 37℃등 3가지 보관온도에서 모두 2개월 동안 초기 활성의 90% 이상의 활성을 유지하고 있다. 이의 준비 기간이 부족한 관계로 최소 6개월까지는 진행하여야 하나, 시간이 부족한 관계로 2개월 동안은 문제가 없어 보임. 일반적으로 상온 보관 조건에서의 유효기간은 37℃-50℃의 가혹 조건에서 보관할 때의 유효기간 보다 약 3배 이상의 기간으로 환산되므로, 현재까지 진행도니 kit의 유효기간은 최소 6개월 이상으로 추정된다. 향후 6개월 및 1년간의 안정성 조사를 통하여 유효기간을 확인하고자 한다.

(7) 키트의 안전성 연구

(가) 안전성 . 유효성 심사 관련 규정 조사

① 본 kit에 포함되어 있는 구성 시약 중 인체에 해를 끼칠 가능성이 있는 시약으로는 mycotoxin 표준물질이며 이 시약에 대한 안전서 연구가 필요하여 해당 관련 법규를 조사하였다.

② 관련규정

1) 약사법 제2조 (정의) ④항 : 의약품이라 함은 1. 대한약전(大韓藥典)에 실린 물품 중 의약외품이 아닌 것, 2. 사람이나 동물의 질병을 진단.치료.경감.처치 또는 예방할 목적으로 사용하는 물품 중 기구·기계 또는 장치가 아닌 것, 3. 사람이나 동물의 구조와 기능에 약리학적(藥理學的) 영향을 줄 목적으로 사용하는 물품 중 기구.기계 또는 장치가 아닌 것. <개정 1965.4.3, 1971.1.13, 2000.1.12>
2) 약사법 제42조 (의약품등의 수입허가 등) ⑤항 : 의약품등의 수입 품목을 허가할 때의 허가 대상·기준·조건 및 관리 등에 필요한 사항은 보건복지부령으로 정한다. <개정 1994.1.7, 1997.12.13>
3) 약사법시행규칙 제23조 (제조.수입품목의 허가신청 등) ①항 : 법 제26조 제1항 또는 법 제34조 제1항의 규정에 의하여 의약품등의 품목허가를 받고자 하는 자는 별지 제12호 서식에 의한 신청서(전자문서로 된 신청서를 포함한다)에 다음 각 호의 구분에 따른 서류(전자문서를 포함한다)를 첨부하여 식품의약품안전처장에게 제출하여야 한다. 나. 기준 및 시험방법 심사결과통지서로서 2년이 지나지 아니한 것, 마. 수입품의 경우, (1) 생산국의 정부 또는 공공기관에서 그 품목이 생산국의 법령에 적합하게 제조되고 있음을 증명하는 제조증명서, (2) 허가 또는 등록국의 정부 또는 공공기관에서 그 품목이 그 국가의 법령에 적합하게 판매되고 있음을 증명하는 판매증명서. <개정 2000.3.3, 2000.6.16, 2002.1.12, 2002.11.5, 2005.10.7>
4) 약사법시행규칙 제27조 (안전성.유효성의 심사) ①항 : 법 제34조 제5항의 규정에 의하여 의약품등의 품목허가 또는 품목변경허가를 받거나 품목신고 또는 품목변경신고를 하고자 하는 자는 다음 각 호의 자료(전자문서를 포함한다)를 갖추어 그 품목에 대한 안전성·유효성의 심사를 받아야 한다. 이 경우 심사대상 품목, 자료작성요령, 각 자료의 요건 및 면제범위·심사기준 등에 관한 세부규정과 독성 및

약리작용 등에 관한 자료의 작성을 위하여 실시하는 비 임상시험의 관리에 필요한 사항은 식품의약품안전처장이 정하는 바에 의한다. <개정 1997.5.21, 2000.3.3, 2000.6.16, 2002.11.5, 2005.10.7.

5) 의약품·의약외품의 제조.수입품목 허가신청(신고)서 검토에 관한 규정 제2조 (정의) ①항 7호 : "체외진단용의약품"이라 함은 인체에서 유래하는 시료를 검체로 하여 검체중의 물질을 검출하거나 측정하여 인체의 질병감염 여부 등을 판정할 목적으로 사용되는 시약을 말하며, 통상 다른 기구 등(보조시약 포함)과의 조합에 의해 사용하는 경우(예 : 키트)를 포함한다. 다만, 체외진단용의약품을 실험실적으로 사용할 때 보조적 또는 부수적으로 사용되는 것으로서 그 자체만으로는 진단 등 목적으로 사용되지 아니하는 실험실적 조제시약, 반응전후 처리시약, 생화학자동분석기용 시약 등과 같은 보조시약류는 제외한다. <식약청고시 제2007-18호, 2007.3.28.>

6) 의약품등의 안전성.유효성 심사에 관한 규정 제3조(심사규정) ①항 : 이 규정에 의한 의약품등의 안전성.유효성 심사는 약사법, 마약류 관리에 관한 법률에 의하여 제조 또는 수입품목허가(변경허가를 포함한다)를 받고자 하는 의약품등을 그 대상으로 한다. 다만, 다음 각 호의 어느 하나에 해당하는 경우는 제외한다. 3. 체외진단용의약품으로서 이미 허가된 바 있는 측정원리를 이용하는 품목(측정항목이 새로운 품목은 제외한다). <식약청고시 제2007-30호, 2007.5.25.>

7) 의약품등의 안전성.유효성 심사에 관한 규정 제5조(의약품등이 제출 자료의 범위) ③항 : 제1항의 규정에 불구하고 체외진단용의약품으로서 측정원리가 새로운 경우 또는 측정항목이 새로운 경우에는 다음 각 호의 자료를 제출하여야 한다. 1. 개발경위, 측정원리 및 방법, 외국의 사용현황, 임상진단상의 의의에 관한 자료, 2. 용법.용량의 설정근거에 관한 자료, 3. 사용상의 주의사항 설정에 관한 자료, 4. 저장방법 및 사용기간의 설정에 관한 자료, 5. 시험결과에 대한 임상적 고찰, 6. 동일목적으로 사용되는 다른 체외진단용의약품과의 상관성에 관한 자료. <식약청고시 제2007-30호, 2007.5.25>

③ Mycotoxin 검출 키트 safety data sheet 초안 작성

○ PRODUCT NAME: **Medexx Aflatoxin B_1, Deoxynivalenol, Ochratoxin A Immuno-PCR kit**

○ MANUFACTURER: Medexx co. Ltd.

○ DIVISION: Research and Development Center

○ Issue Date: 07/28/17

○ This product is a kit or a multipart product which consists of multiple, independently packaged components. An MSDS for each of these components is included. Please do not separate the component MSDSs from this cover page. The document numbers of the MSDSs for components of this product are: 22-8703-5, 22-9033-6, 22-8715-9, 22-9038-5, 22-9172-2, 22-8711-8, 22-8705-0, 22-8712-6, 22-8720-9

○ Use or application. Given the variety of factors that can affect the use and application of a Medexx product, some of which are uniquely within the user's knowledge and control, it

is essential that the user evaluate the Medexx product to determine whether it is fit for a particular purpose and suitable for user's method of use or application. Medexx provides information in electronic form as a service to its customers. Due to the remote possibility that electronic transfer may have resulted in errors, omissions or alterations in this information, Medexx makes no representations as to its completeness or accuracy. In addition, information obtained from a database may not be as current as the information in the MSDS available ○ directly from Medexx.

○ EMERGENCY OVERVIEW

- Odor, Color, Grade: Colorless liquid
- General Physical Form: Liquid
- Immediate health, physical, and environmental hazards:

○ POTENTIAL HEALTH EFFECTS MATERIAL SAFETY DATA SHEET

- Eye Contact: Mild Eye Irritation: Signs/symptoms may include redness, pain, and tearing.
- Skin Contact: Mild Skin Irritation: Signs/symptoms may include localized redness, swelling, and itching.
- Inhalation: Respiratory Tract Irritation: Signs/symptoms may include cough, sneezing, nasal discharge, headache, hoarseness, and nose and throat pain. May be absorbed following inhalation and cause target organ effects.
- Ingestion: Gastrointestinal Irritation: Signs/symptoms may include abdominal pain, stomach upset, nausea, vomiting and diarrhea. May be absorbed following ingestion and cause target organ effects.
- Target Organ Effects: Prolonged or repeated exposure may cause:
- Liver Effects: Signs/symptoms may include loss of appetite, weight loss, fatigue, weakness, abdominal tenderness and jaundice.
- Kidney/Bladder Effects: Signs/symptoms may include changes in urine production, abdominal or lower back pain, increased protein in urine, increased blood urea nitrogen (BUN), blood in urine, and painful urination.

○ FIRST AID PROCEDURES

- The following first aid recommendations are based on an assumption that appropriate personal and industrial hygiene practices are followed.
- Eye Contact: Flush eyes with large amounts of water. If signs/symptoms persist, get medical attention.
- Skin Contact: Wash affected area with soap and water. If signs/symptoms develop, get medical attention.
- Inhalation: Remove person to fresh air. If signs/symptoms develop, get medical attention. If Swallowed: Do not induce vomiting unless instructed to do so by medical personnel. Give victim two glasses of water. Never give anything by mouth to an unconscious person. Get medical attention.

○ FLAMMABLE PROPERTIES

- Autoignition temperature Not Applicable
- Flash Point Not Applicable
- Flammable Limits - LEL Not Applicable

- Flammable Limits - UEL Not Applicable

○ EXTINGUISHING MEDIA

- Material will not burn. Use fire extinguishers with class B extinguishing agents (e.g., dry chemical, carbon dioxide).

○ PROTECTION OF FIRE FIGHTERS

- Special Fire Fighting Procedures: Wear full protective equipment (Bunker Gear) and a self-contained breathing apparatus
- Unusual Fire and Explosion Hazards: Not applicable.
- Note: See STABILITY AND REACTIVITY (SECTION 10) for hazardous combustion and thermal decomposition information.

○ Personal precautions

- Evacuate unprotected and untrained personnel from hazard area. The spill should be cleaned up by qualified personnel. Ventilate the area with fresh air. For large spill, or spills in confined spaces, provide mechanical ventilation to disperse or exhaust vapors, in accordance with good industrial hygiene practice. Warning! A motor could be an ignition source and could cause flammable gases or vapors in the spill area to burn or explode. Remember, adding an absorbent material does not remove a toxic, corrosivity or flammability hazard.

○ Environmental procedures

- For larger spills, cover drains and build dikes to prevent entry into sewer systems or bodies of water. Collect the resulting residue containing solution. Place in a metal container approved for transportation by appropriate authorities. Dispose of collected material as soon as possible.

○ Clean-up methods

- Refer to other sections of this MSDS for information regarding physical and health hazards, respiratory protection, ventilation, and personal protective equipment. Call Medexx-HELPS line (1-800-364-3577) for more information on handling and managing the spill. Contain spill. Working from around the edges of the spill inward, cover with bentonite, vermiculite, or commercially available inorganic absorbent material. Mix in sufficient absorbent until it appears dry. Collect as much of the spilled material as possible. Clean up residue with an appropriate solvent selected by a qualified and authorized person. Ventilate the area with fresh air. Read and follow safety precautions on the solvent label and MSDS. In the event of a release of this material, the user should determine if the release qualifies as reportable according to local, state, and federal regulations.

○ HANDLING

- Avoid eye contact. Do not eat, drink or smoke when using this product. Wash exposed areas thoroughly with soap and water. Avoid breathing of vapors, mists or spray. Avoid skin contact. Use general dilution ventilation and/or local exhaust ventilation to control airborne exposures to below Occupational Exposure Limits. If ventilation is not adequate, use respiratory protection equipment.

○ STORAGE

- Store in a cool place.

○ ENGINEERING CONTROLS

- Use with appropriate local exhaust ventilation. Use general dilution ventilation and/or local exhaust ventilation to control airborne exposures to below Occupational Exposure Limits and/or control mist, vapor, or spray. If ventilation is not adequate, use respiratory protection equipment.

○ Eye/Face Protection

- Avoid eye contact. The following eye protection(s) are recommended: Safety Glasses with side shields

○ Skin Protection

- Avoid skin contact. Select and use gloves and/or protective clothing to prevent skin contact based on the results of an exposure assessment. Consult with your glove and/or protective clothing manufacturer for selection of appropriate compatible materials. Gloves made from the following material(s) are recommended: Nitrile Rubber Selection and use of gloves is recommended to prevent skin contact.

○ Respiratory Protection

- Under normal use conditions, airborne exposures are not expected to be significant enough to require respiratory protection. Avoid breathing of vapors, mists or spray.

○ Prevention of Swallowing

- Do not eat, drink or smoke when using this product. Wash exposed areas thoroughly with soap and water. Not applicable.

○ PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES

- General Physical Form: Liquid
- Autoignition temperature Not Applicable
- Flash Point Not Applicable
- Flammable Limits - LEL Not Applicable
- Flammable Limits - UEL Not Applicable
- Boiling point No Data Available
- Density No Data Available
- Vapor Density No Data Available
- Vapor Pressure No Data Available
- Specific Gravity >= 1
- pH No Data Available
- Melting point No Data Available
- Solubility In Water Not Applicable
- Evaporation rate No Data Available
- Hazardous Air Pollutants 0.005 - 0.01 % weight
- Volatile Organic Compounds 0
- Kow - Oct/Water partition coef No Data Available
- Percent volatile 0
- VOC Less H2O & Exempt Solvents 0
- Viscosity No Data Available

○ TOXICOLOGICAL INFORMATION

- Please contact the address listed on the first page of the MSDS for Toxicological Information on this material and/or its components.

○ ECOLOGICAL INFORMATION

○ CHEMICAL FATE INFORMATION

○ DISPOSAL CONSIDERATIONS

- Waste Disposal Method: Dispose of waste product in a permitted hazardous waste facility.
- EPA Hazardous Waste Number (RCRA): D009 (Mercury)
- Since regulations vary, consult applicable regulations or authorities before disposal.

○ Fire Hazard - No Pressure Hazard - No Reactivity Hazard - No Immediate Hazard - Yes Delayed Hazard - Yes

○ SECTION 16: OTHER INFORMATION

- NFPA Hazard Classification
- Health: 2 Flammability: 0 Reactivity: 0 Special Hazards: None
- National Fire Protection Association (NFPA) hazard ratings are designed for use by emergency response personnel to address the hazards that are presented by short-term, acute exposure to a material under conditions of fire, spill, or similar emergencies. Hazard ratings are primarily based on the inherent physical and toxic properties of the material but also include the toxic properties of combustion or decomposition products that are known to be generated in significant quantities.
- Reason for Reissue: Updated waste disposal section.

4. 2차 시제품을 위한(aflatoxin M_1, T-2 toxin, Zearalenone) Capture antibody 흡착플레이트 제작

가. Aflatoxin M_1 항체 흡착플레이트 제작

(1) Coating buffer 조건 확립

: 96-well microplate에 최적의 항체코팅을 위한 코팅버퍼를 결정하기 위해서 일반적으로 많이 사용되는 3가지 버퍼에서의 최적의 결과를 확인함.

- ◦ Aflatoxin M_1 항체를 50mM carbonate buffer(pH9.6), 20mM PBS(pH7.2) 그리고 20mM Tris-HCl(pH7.4)에 10ug/mL 되게 희석하여 4℃에서 overnight 반응시킴.
- ◦ 3번 세척한 후, 1,000, 100, 10, 1, 0 ng/mL의 Aflatoxin M_1과 aflatoxin M_1-HRP conjugate를 동시에 넣고 37℃에서 1시간 반응시킴.
- ◦ 5번 세척 후 TMB substrate를 넣고 20분 반응시킴.
- ◦ Stop solution 넣고 반응 정지시킨 후, 450nm에서 흡광도 측정함.
- ◦ 50mM carbonate buffer가 PBS와 Tris-HCl 버퍼보다 저농도와 고농도 aflatoxin M_1과의 반응성이 뛰어난 것으로 확인됨.

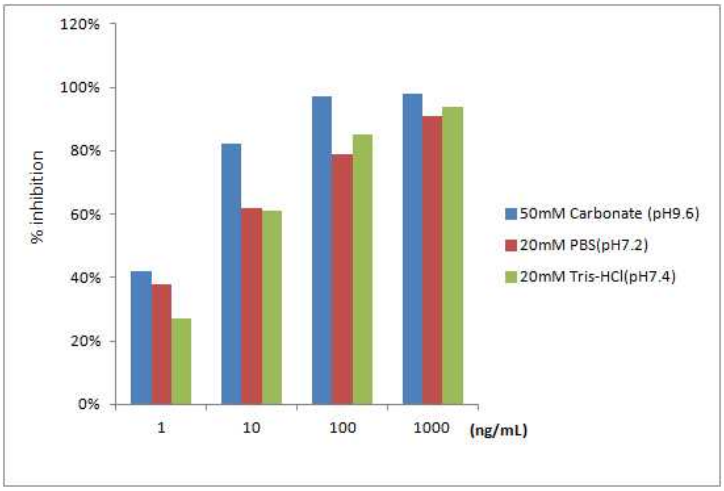


그림 48. Optimization of coating buffer condition using anti-aflatoxin M_1 antibody

(2) Coating 항체 농도 결정

- Microplate에 코팅하는 최적 항체량을 결정하기 위해 50mM carbonate coating buffer(pH9.6)에 항체를 10,000, 1,000 500 100ng/mL 농도로 희석하여 4℃에서 overnight 코팅시킴.
- 3번 세척한 후, aflatoxin M_1 1, 10, 1,00, 1000 ng/mL 과 aflatoxin M_1-HRP conjugate 를 넣고 37℃에서 1시간 반응시킴.
- 5번 세척 후, TMB substrate 넣고 20분 반응시킴.
- Stop solution 넣고 450nm에서 흡광도를 측정함.
- Aflatoxin M_1 항체의 최적의 코팅량은 10,000ng/mL인 것으로 결정함.

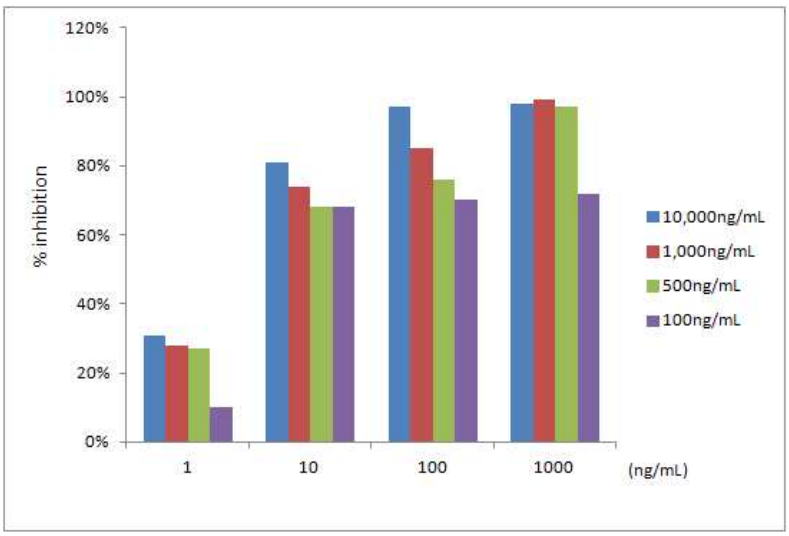


그림 49. Optimization of coating concentration for anti-aflatoxin M_1 antibody

(3) Coating 조건 확립

: ELISA plate에 항체코팅을 위한 온도 및 시간의 최적조건 확립

- Aflatoxin M_1 항체를 carbonate buffer(pH9.6)에 10,000ng/mL 되게 희석하여 4℃에서 1hr, 2hr 그리고 3hr 조건과 37℃에서 1hr, 2hr, 3hr 동안 반응시킴.

◦ 반응시간이 끝나면 3번 세척한 후, aflatoxin M_1 톡신 1, 10, 100, 1,000ng/mL 농도를 aflatoxin M_1-HRP conjugate와 함께 37℃에서 1시간 반응시킴.
◦ 반응완료 후, 5번 세척 후, TMB substrate를 넣고 20분 반응시킴.
◦ Stop solution을 넣고 450nm에서 흡광도를 측정하여 Inhibition percentage(%)를 계산함.
◦ 37℃에서 1시간과 2시간에서 큰 차이가 없어 1시간 코팅하는 것으로 결정함.

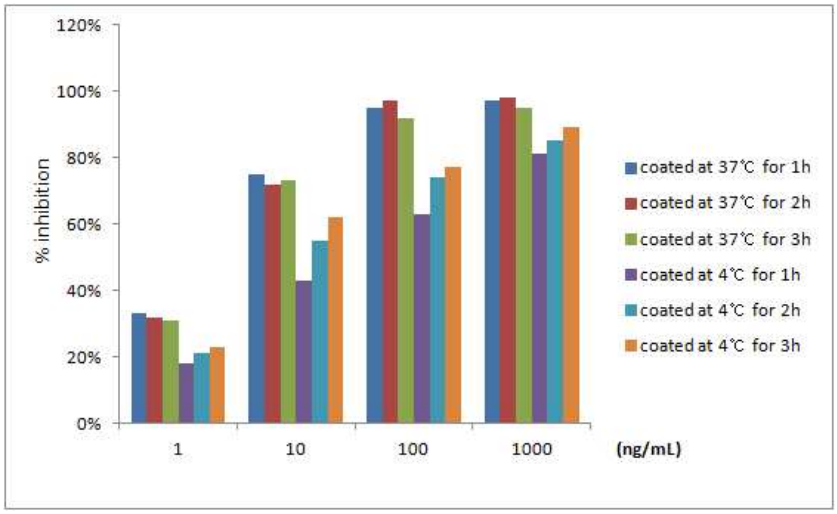


그림 50. Optimization of coating condition using anti-aflatoxin M_1 antibody

나. T-2 toxin 항체 흡착플레이트 제작

(1) Coating buffer 조건확립

◦ aflatoxin M_1 항체와 같이 50mM carbonate buffer(pH9.6), 20mM PBS(pH7.2) 그리고 20mM Tris-HCl(pH7.4)에 10ug/mL 농도의 deoxynivalenol 항체를 microplate에 넣고 4℃에서 overnight coating 시킴.
◦ 3번 세척한 후, 1,000, 100, 10, 1, 0 ng/mL의 T-2 톡신과 T_2-HRP conjugate를 넣고 37℃에서 1시간 반응시킴.
◦ 5번 세척 후 TMB substrate를 넣고 20분 반응시킴.
◦ Stop solution 넣고 반응 정지시킨 후, 450nm에서 흡광도 측정함.
◦ 50mM carbonate buffer에서 저농도와 고농도의 T-2 톡신과의 반응성이 뛰어난 것으로 확인됨.

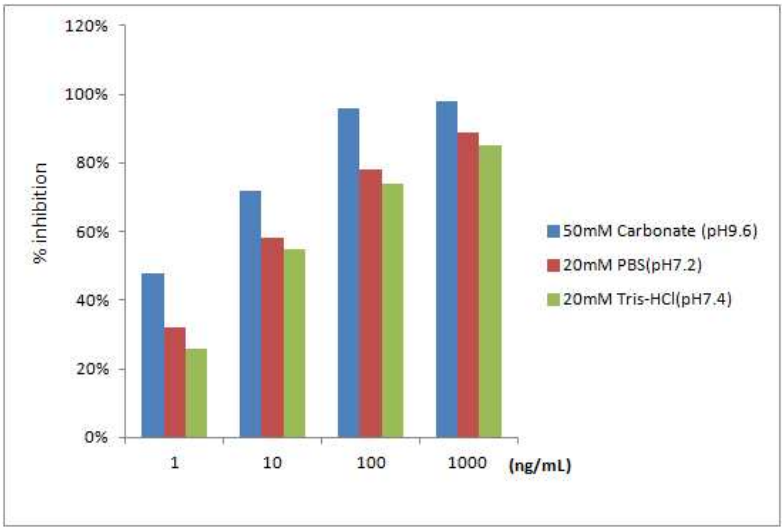


그림 51. Optimization of coating buffer condition for T-2 antibody

(2) Coating 항체 농도 결정

- Microplate에 코팅하는 최적 항체량을 결정하기 위해 50mM carbonate coating buffer(pH9.6)에 항체를 10,000 1,000, 500, 100ng/mL 농도로 희석하여 4℃에서 overnight 반응시킴.
- 3번 세척한 후, T-2 톡신을 1, 10, 100, 1,000 ng/mL 과 T_2-HRP conjugate를 넣고 37℃에서 1시간 반응시킴.
- 5번 세척 후, TMB substrate 넣고 20분 반응시킴.
- Stop solution 넣고 450nm에서 흡광도를 측정함.
- T-2 항체 코팅량은 10,000ng/mL과 1,000ng/mL 코팅양에서 비슷한 결과가 나와 항체량이 적게 들어가는 1,000ng/mL로 결정하였음.

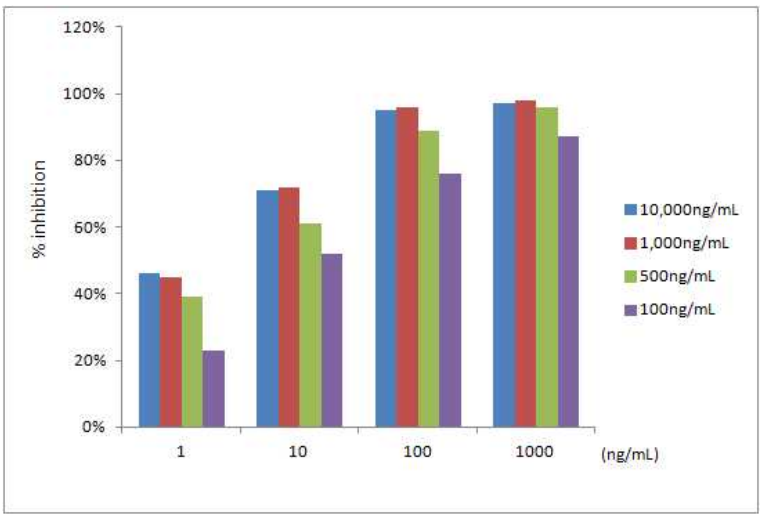


그림 52. Optimization of coating concentration for T-2 antibody

(3) Coating 조건 확립

: ELISA plate에 항체코팅을 위한 온도 및 시간의 최적조건 확립

- T-2 톡신 항체를 carbonate buffer(pH9.6)에 1,000ng/mL 되게 희석하여 4℃에서 1h, 2h 그리고 3h 조건과 37℃에서 1h, 2h 그리고 3h 동안 반응시킴.
- 반응시간이 끝나면 3번 세척한 후, T-2 톡신 1, 10, 100, 1,000ng/mL 농도를 T_2-HRP

conjugate와 함께 37℃에서 1시간 반응시킴.

- ○ 반응완료 후, 5번 세척 후, TMB substrate를 넣고 20분 반응시킴.
- ○ Stop solution을 넣고 450nm에서 흡광도를 측정하여 Inhibition percentage(%)를 계산함.
- ○ 37℃에서 1시간과 2시간 큰 차이를 보이지 않아 1시간 37도씨 코팅하는 것으로 결정함.

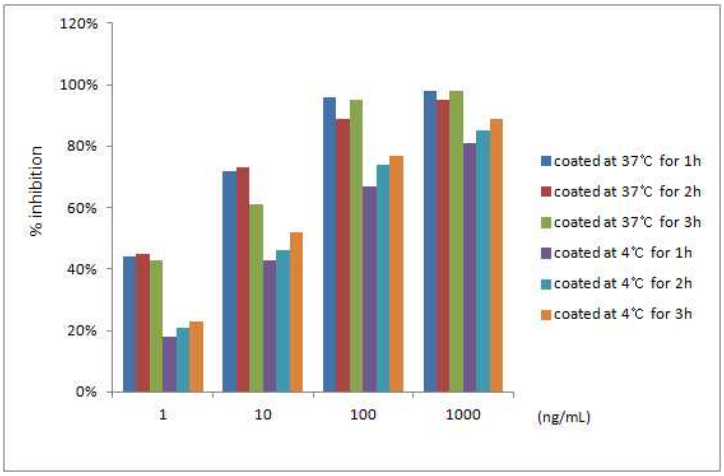


그림 53. Optimization of coating condition for T-2 antibody

다. Zearalenone 항체 흡착플레이트 제작

(1) Coating buffer 조건확립

- ○ Aflatoxin M_1 항체와 같이 50mM carbonate buffer(pH9.6), 20mM PBS(pH7.2) 그리고 20mM Tris-HCl(pH7.4)에 10ug/mL 농도의 zearalenone 항체를 microplate에 넣고 4℃에서 overnight coating 시킴.
- ○ 3번 세척한 후, 1,000, 100, 10, 1, 0 ng/mL의 zearalenone 톡신과 zearalenone-HRP conjugate를 동시에 넣고 37℃에서 1시간 반응시킴.
- ○ 5번 세척 후 TMB substrate를 넣고 20분 반응시킴.
- ○ Stop solution 넣고 반응 정지시킨 후, 450nm에서 흡광도 측정함.
- ○ 50mM carbonate buffer에서 저농도와 고농도의 zearalenone과의 반응성이 뛰어난 것으로 확인됨.

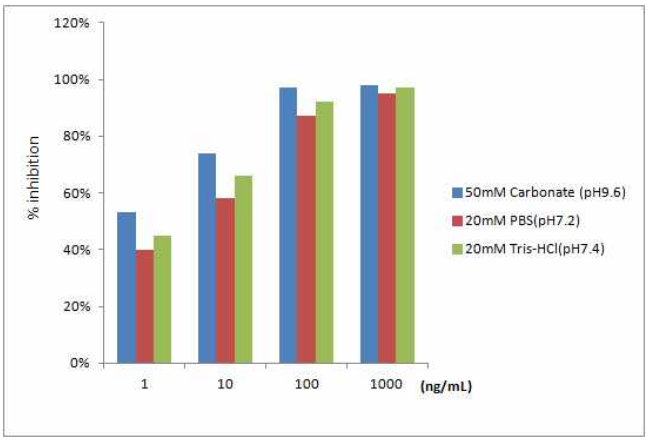


그림 54. Optimization of coating buffer condition for zearalenone antibody

(2) Coating 항체 농도 결정

- Microplate에 코팅하는 최적 항체량을 결정하기 위해 항체를 50mM carbonate coating buffer(pH9.6)에 10,000 1,000, 500, 100ng/mL 농도로 희석하여 4℃에서 overnight 반응시킴.
- 3번 세척한 후, zearalenone 톡신을 1, 10, 100, 1,000ng/mL 과 zearalenone-HRP conjugate를 넣고 37℃에서 1시간 반응시킴.
- 5번 세척 후, TMB substrate 넣고 20분 반응시킴.
- Stop solution 넣고 450nm에서 흡광도를 측정함.
- 5D3 clone의 항체를 10,000ng/mL 코팅양이 가장 적합한 것으로 판단됨.

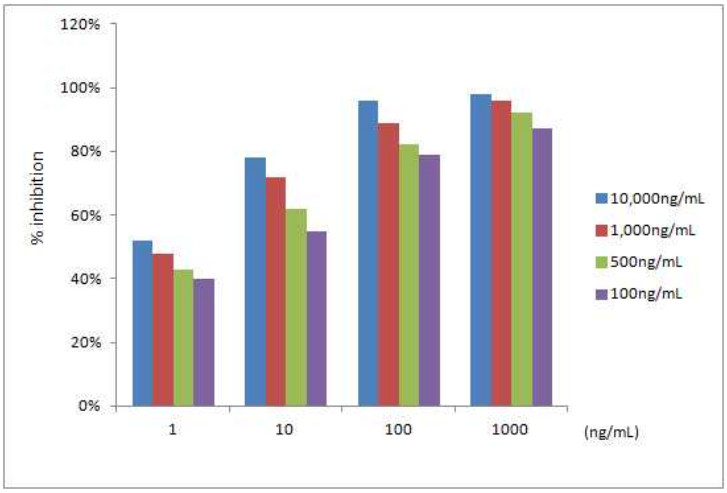


그림 55. Optimization of coating buffer condition for zearalenone antibody

(3) Coating 조건 확립

: ELISA plate에 항체코팅을 위한 온도 및 시간의 최적조건 확립

- Zearalenone 항체를 carbonate buffer(pH9.6)에 10,000ng/mL 되게 희석하여 4℃에서 1h, 2h 그리고 3h 조건과 37℃에서 1h, 2h 그리고 3h 동안 반응시킴.
- 반응시간이 끝나면 3번 세척한 후, zearalenone 톡신 1, 10, 100, 1,000ng/mL 농도를 zearalenone-HRP conjugate와 함께 37℃에서 1시간 반응시킴.
- 반응완료 후, 5번 세척 후, TMB substrate를 넣고 20분 반응시킴.
- Stop solution을 넣고 450nm에서 흡광도를 측정하여 Inhibition percentage(%)를 계산함.
- 37℃에서 1시간 과 2시간 차이가 없어 1시간 코팅하는 것으로 결정함.

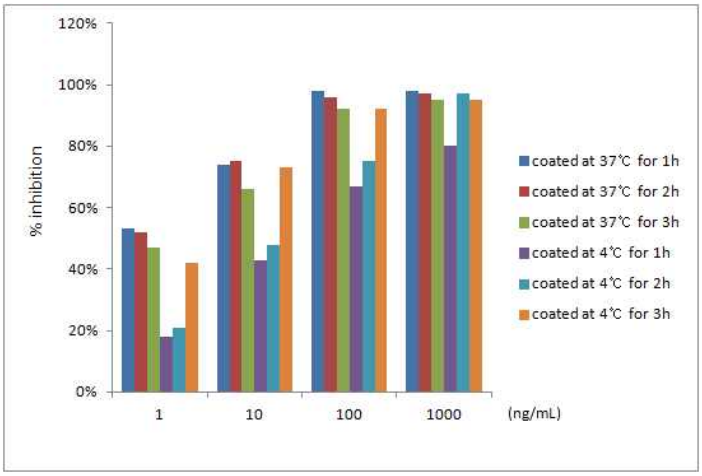


그림 56. Optimization of coating condition for zearalenone antibody

5. 2차 시제품을 위한 Detection antibody 제작 및 키트 내 사용 농도 설정

가. Biotinylated-Reporter double strand DNA 제작

(1) Reporter DNA의 제작

- Reporter DNA의 서열은 아래와 같이 eukaryotic과 prokaryotic origin의 두개의 fragment를 연결한 구조를 가지게 하여 자연계에 존재하지 않는 인위적인 시퀀스를 디자인 함(참고 문헌: Journal of food safety (2014, 34(3):249-256) A Quantitative Real-Time Immuno-PCR Assay for Detection of Staphylococcus Aureus Enterotoxin H, 농림수산과학기술기획평가원 보고서 황색포도상균 장독소 정량키트개발, 한국소비자원, 2012))
  -5'-TATCCAATCCATTCCAGGCCCTGTCCAGGCCTCTGTTTCACCCAGTTTATACCGTAGCTTGTGAATGTATATCCAGAAGCCTTGCAGGACATCTTCACTGAGGACAAGGGCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTT-3'.총 길이 246-bp
- Biotinylated Reporter DNA 효과적이고 지속적인 생산을 위하여 보고서 1절에서 개발된 pET30a backbone system을 이용하기 위해 위 reporter DNA sequence를 pET30a multicloning sites 중 Hind III와 Bgl II 위치에 directional clononing 함.
- 5`- Biotin - CTTTGTTAGCAGCCGGATCTC -3` 와 5`- GCTAAATTCGAACGCCAGCA -3` primer를 사용하여 cloning 된 Pet30a plasmid를 template으로 사용하여 아래 조건과 같이 PCR을 진행하여 Biotinylated reporter DNA를 제작함.
  PCR condition : 95˚C/5min, 40 cycle (95˚C1min, 53˚C/1min, 72˚C/2min), 72˚C/7min
- 생산된 reporter DNA는 다양한 마이코톡신 검출에 공통적으로 사용되며, Reporter DNA detection primer는 forward primer 5'-AAGCCTTGCAGGACATCTTCA-3' 와 reverse primer 5'-GCCGCCAGTGTGAT GGATAT-3'이며 증폭 산물의 크기는 67 bp

임을 확인하였다.

나. Streptavidin-antibody 결합물 생성 및 항체 키트 내 사용농도 설정

(1) Streptavidin-antibody conjugation

- 1차 시제품 제작시 설정한 동일한 조건으로 수행.

(2) Anti-aflatoxin M_1-Detection antibody 최적농도 확인 시험.

- 1ug/mL 농도의 Aflatoxin M_1-BSA conjugate를 microplate에 넣고 4℃에서 overnight 반응시킴.
- 3번 세척 후, anti-aflatoxin M_1-streptavidin conjugate를 1, 10, 100, 1,000, 10,000ng/mL 농도로 희석하여 각 well에 넣고 37℃에서 1시간 반응시킴.
- 반응이 완료되면 3번 세척 후, anti-streptavidin antibody-HRP을 넣고 37℃에서 1시간 반응시킴.
- 5번 세척 후, TMB substrate 넣고 20분 반응시킴.
- Stop solution 넣고 450nm에서 흡광도 측정함.
- Aflatoxin M_1 antibody-streptavidin conjugate의 사용 가능한 농도는 100ng/mL 농도인 것으로 확인됨.

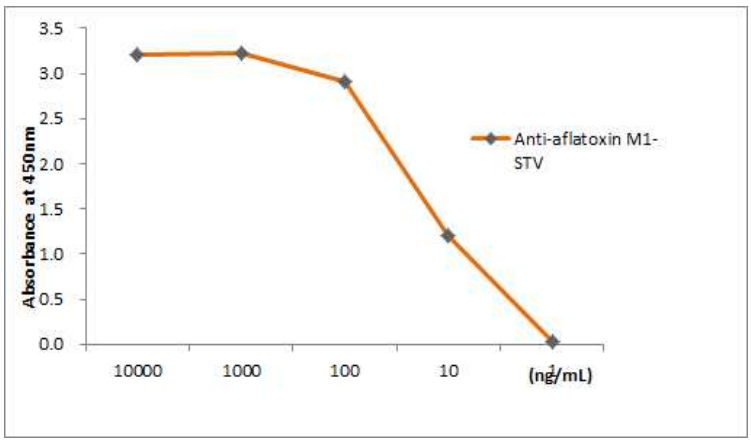


그림 57. Titration of anti-aflatoxin M_1 and streptavidin conjugate

(3) Anti-T_2-Detection antibody 최적농도 확인 시험.

- 1ug/mL 농도의 T_2-BSA conjugate를 microplate에 넣고 4℃에서 overnight 반응시킴.
- 3번 세척 후, anti-T_2-streptavidin conjugate를 1, 10, 100, 1,000, 10,000ng/mL 농도로 희석하여 각 well에 넣고 37℃에서 1시간 반응시킴.
- 반응이 완료되면 3번 세척 후, anti-streptavidin antibody-HRP을 넣고 37℃에서 1시간 반응시킴.
- 5번 세척 후, TMB substrate 넣고 20분 반응시킴.
- Stop solution 넣고 450nm에서 흡광도 측정함.
- anti-T_2-streptavidin conjugate의 working 농도는 100ng/mL까지 사용 가능할 것으로 판단됨.

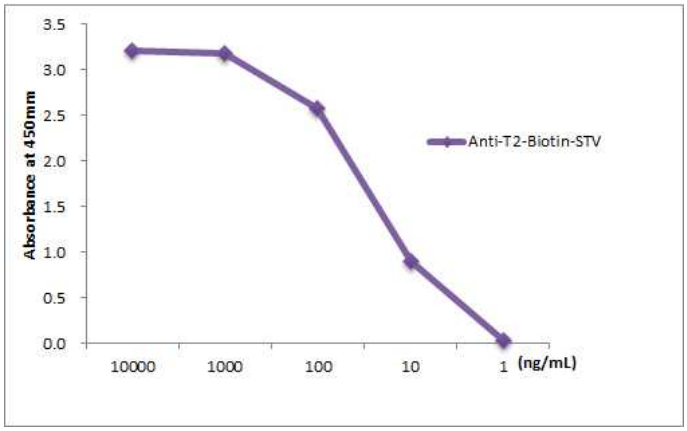


그림 58. Titration of anti-T_2 and streptavidin conjugate

(4) Anti-zearalenone-Detection antibody 최적농도 확인 시험.

- 1ug/mL 농도의 zearalenone-BSA conjugate를 microplate에 넣고 4℃에서 overnight 반응시킴.
- 3번 세척 후, anti-zearalenone-streptavidin conjugate를 1, 10, 100, 1,000, 10,000ng/mL 농도로 희석하여 각 well에 넣고 37℃에서 1시간 반응시킴.
- 반응이 완료되면 3번 세척 후, anti-streptavidin antibody-HRP을 넣고 37℃에서 1시간 반응시킴.
- 5번 세척 후, TMB substrate 넣고 20분 반응시킴.
- Stop solution 넣고 450nm에서 흡광도 측정함.
- Anti-zearalenone-streptavidin conjugate의 역가는 100ng/mL까지 사용 가능한 것으로 확인함.

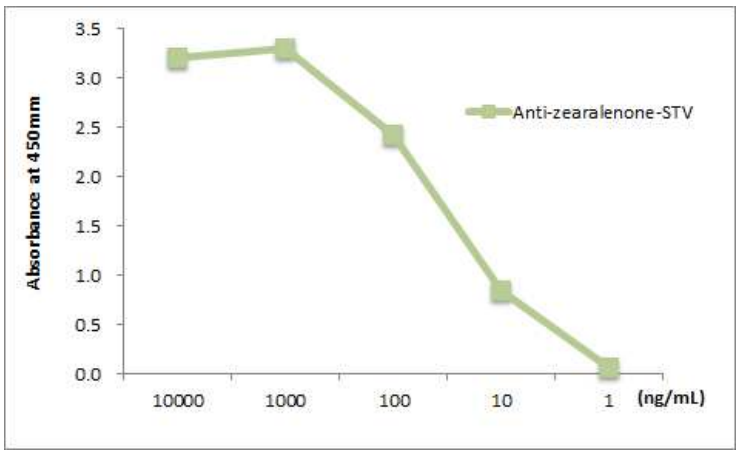


그림 59. Titration of anti-zearalenone-streptavidin conjugate

다. Streptavidin-antibody-biotinylated reporter dsDNA 결합물 고정화 및 정제

- 제 1절의 실험 결과에 준 해, Streptavidin-antibody 와 biotinylated reporter dsDNA 비율을 Aflatoxin M_1, T-2 mycotoxin의 경우 1:1, Zearalenone의 경우 1:2의 비율로 30분간 실온에서 반응 시키고, Antibody Purification Kit (Protein G. ab128747)를 사용하여 정제하였다. 본 과제 초기 시제품은 이러한 결합물을 자체 제작하게 디자인

되었으나, 최종 제품의 경우 Detection antibody-biotinylated reporter dsDNA 결합물을 키트와 같이 공급하여 사용자가 편리하게 사용할 수 있도록 개선할 예정임.

6. 2차 시제품 생산 (Aflatoxin M_1, T-2, Zearalenone)

가. 시제품 생산

(1) 구성 시약 제조

○ Antibody-reporter, washing buffer는 직접 제조하여 제공하고 나머지 필요시약은 주문 생산 또는 구입 후, 분주하여 제공하는 것으로 하였음.

- Immunoassay plate(12 strips, 8 well per strip)
- Washing buffer, 20X, 50mL
- Mycotoxin standard, 1ug/mL, 300uL
- Ab-STV-Biotin-reporter, 1mL
- Restriction Enzyme, 150uL
- 10X Restriction Enzyme buffer, 500uL
- RT-PCR PreMixture(96 tubes, 8 X 12 strips)

(2) Kit의 제조공정

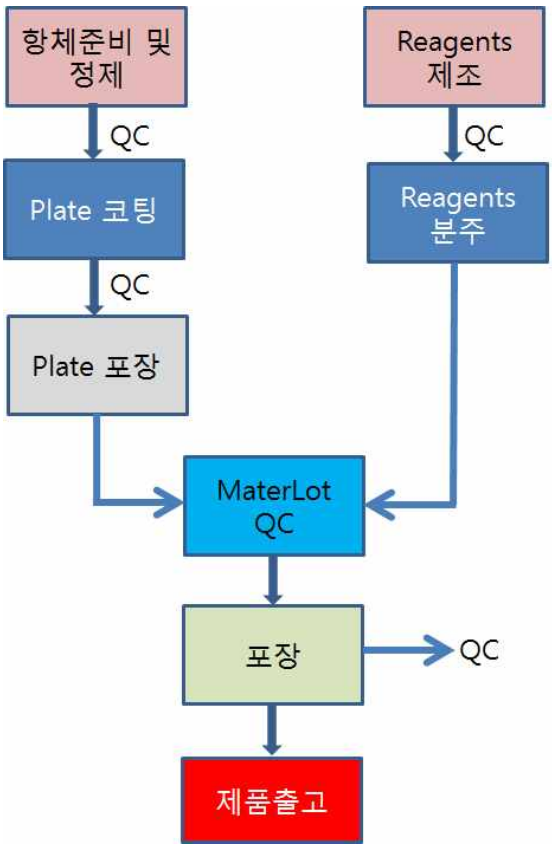


그림 60. Kit의 제조공정

3) 대량생산을 위한 prototype의 시연 및 평가

- 제품 prototype

① Mycotoxin (Aflatoxin M_1, Zearalenone, T-2 toxin) standard, 1μg/mL, 300μl

② Ab-STV-Biotin-reporter, 1mL

③ Washing buffer, 20X, 50mL

④ 10X Restriction enzyme buffer, 500μl

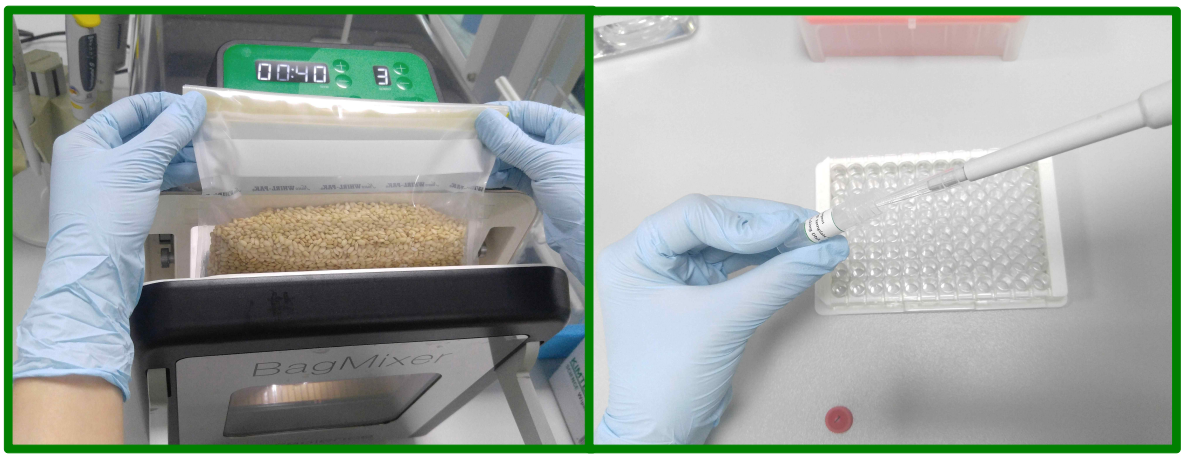
⑤ Restriction enzyme, 150μl

⑥ RT-PCR Premixture tube(8X12 strips=96 tubes)

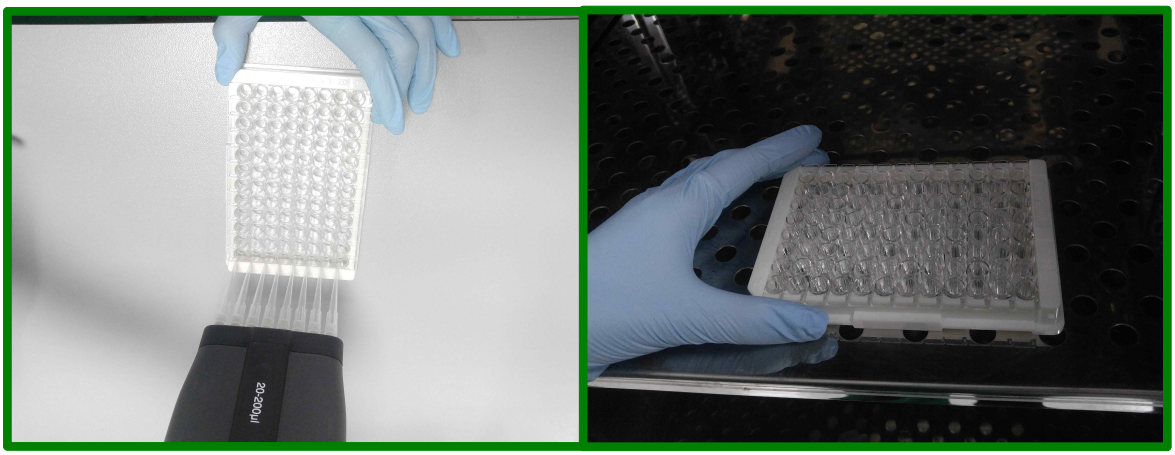
⑦ Immunoassay plate(12 strips, 8 well per strip)

(4) 시연 과정

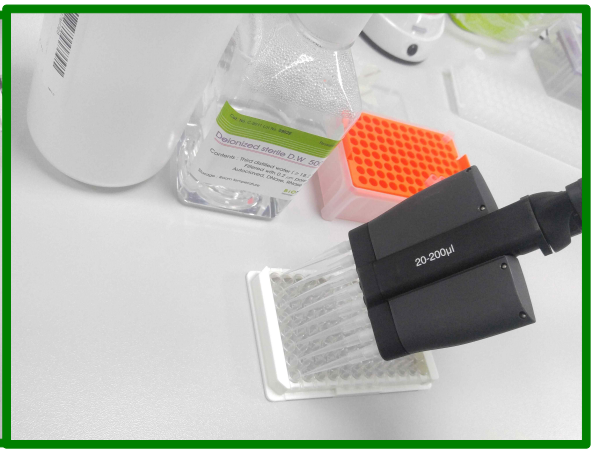
① stomaker를 이용한 샘플 준비 및 제공된 Mycotoxin(Aflatoxin M_1, Zearalenone, T-2 toxin) standard 준비하여 각 well에 넣고 37℃, 20분 반응시킨다.

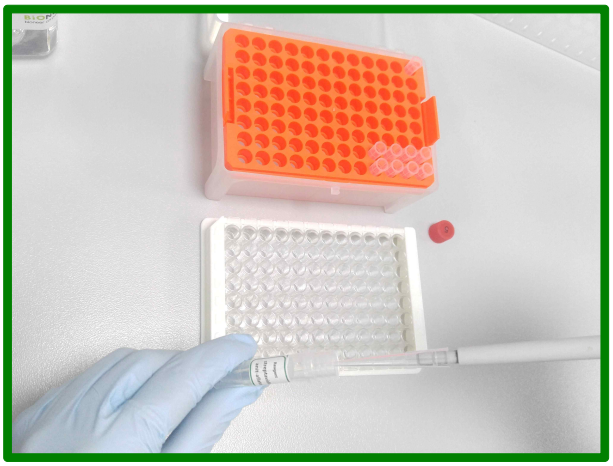


② 세척한 후, Ab-STV-Biotin-reporter DNA 희석액 넣고 37℃, 20분 반응시킨다.



③ Microplate shaker를 이용하여 세척한 후, Restriction enzyme 처리하여 37℃, 15분 반응시킨다.





④ Real time PCR 반응 후 결과를 분석한다.

라. Kit의 prototype을 위한 protocol의 정립 및 시제품 생산

LIST OF COMPONENTS
① Mycotoxin (Aflatoxin M_1, Zearalenone, T-2 toxin) standard, 1µg/mL, 300µl

② Ab-STV-Biotin-reporter, 1mL
③ Washing buffer, 20X, 50mL
④ 10X Restriction enzyme buffer, 500μl
⑤ Restriction enzyme, 150μl
⑥ RT-PCR Premixture tube(8X12 strips=96 tubes)
⑦ Immunoassay plate(12 strips, 8 well per strip)

MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

. Stomaker
. Incubator
. Refrigerator
. Centrifuge
. Real-time PCR device and analysis software
. Micropipettor (s) and disposable pipette tips
. Multi-channel pipette capable of dispensing 50-100μl
. Solution reservoir (recommended)
. Microtiter plate washer (recommended)
. Orbital plate shaker capable of 300-500rpm (recommended)
. Well-closed containers (15ml tubes or more in capacity)

B. Performing Immuno-Assay

1. 샘플 준비: 고체 시료의 경우 5 g, 액체 시료의 경우 5 ml을 측정하여 45 ml의 DW (또는 75% Methanol)와 섞은 후 stomaker 등을 이용하여 진탕한 후 이 중에서 1 ml을 1200 rpm, 10 분간 centrifuge하여 상층액을 1.5 ml tube에 옮겨 놓고 4˚C에 보관합니다.

2. 샘플 well 준비 (Preparing the Sample Wells; Reagent ⑦): 포장을 뜯은 후 필요한 수만큼의 well 을 떼어냅니다. 이 때 각 샘플마다 2개의 well이 필요하며 한 회 실험당 control및 standard curve 작성을 위한 well 6개를 더 준비해 주십시오. 뜯어낸 well들을 holder에 끼워줍니다.

3. Standard 준비: 제공된 Mycotoxin standard(Reagent ①)를 10 μl 취하여 PBS 90 μl에 희석합니다. 이것을 기준으로 10배수씩 단계적으로 PBS에 희석한 것을 4개 더 만듭니다.

4. B-1과 B-3에서 준비한 샘플과 standard를 각 well에 넣고 37˚C, 20분 반응시킵니다.

4. Well을 희석한 1X washing buffer(Reagent ③)로 세척합니다.

5. 1X로 희석한 Ab-STV-Biotin-reporter(Reagent ②)를 각 well에 100 μl 분주 후 37˚C, 20분 반응시킵니다.

6. 반응액을 털어내고 1X wash buffer를 300 µl/well 분주하여 1분간 vigorously shaking하여 세척합니다.

7. B-6과 같은 방법으로 4회 세척합니다.

8. 각 well에 10X Restriction enzyme buffer(Reagent ④) 2uL, Restriction enzyme(Reagent ⑤) 1uL, DW 17uL을 넣고 37˚C, 15분 반응시킵니다.

9. 상층액을 well당 5 µl씩 따서 다음 과정의 template로 사용합니다.

C. real-time PCR

1. B-9에서 준비된 각각의 template 5µl를 RT-PCR Premixture(Reagent ⑥)에 넣고 real-time PCR 준비를 합니다.

2. 다음 조건하에 real-time을 실시합니다. 95˚C, 10min → 40 cycles of 95˚C, 15sec and 62˚C, 1min

3. Threshold를 0.5로 설정하기를 권장하나 standard Mycotoxin well의 결과에 따라 소프트웨어 별로 권장하는 threshold가 다를 수 있습니다.

4. 5개의 Mycotoxin standard well에서 얻어진 Ct 값이 25 이하가 아니거나, PBS만을 넣은 negative control well에서 얻어진 Ct값이 30 이상이 아니면 잘못된 실험입니다.

5. 5개의 Mycotoxin standard well에서 얻어진 Ct 값을 이용하여 추세선을 작성하신 후, 2개의 sample well에서 얻어진 평균 Ct 값을 대입하셔서 샘플에서의 Mycotoxin 농도를 산출합니다. 이 두개의 Ct값 차이가 1 이상 나타나면 잘못된 실험입니다. 이때, 최초 희석 농도인 10배를 감안하여 최종 계산에 반영합니다.

MEDEXX
Deoxynivalenol Immuno-PCR Kit (DONIA)
Immunoquantitative real-time PCR kit (96 kits)
IVD
Immunoassay plate
MEDEXX
Deoxynivalenol Immuno-PCR Kit (DONIA)
Immunoquantitative real-time PCR kit (96 kits)
IVD
LOT

그림 61. 완성된 시제품

마. 시약의 안정성 평가, Antibody coated plate stability test

(가) 연구 방법

- 제작된 kit를 4℃, 25℃, 37℃ 등 3가지 온도에서 보관하였으며, 4일, 11일, 18일, 25일 째 음성 시료를 이용하여 검사를 수행하여 키트 제작시(MasterLot) 활성도(activity)를 100% 기준으로 보관온도와 시간에 따른 활성도를 확인하였음.

(나) 연구 결과

- 본 키트의 경우 4℃, 25℃, 37℃등 3가지 보관온도에서 모두 25일 동안 초기 활성을 확인하였다. 37℃에서 6종 키트 모두 80% 이상의 활성을 유지하여 4℃ 키트 보관온도로 환산했을 경우 375일, 즉 1년 이상의 키트활성을 유지하여 유효기간을 1년으로 확인되었다(그림 62). 키트 보관온도인 4℃에서는 실제 키트의 안정성을 계속해서 확인할 계획이다.

그림 62. Antibody coated plate stability test

Plate stability test(Coated antibody stability)

Aflatoxin B1

Storage Temp	Storage period(days)	Equal to days at 4℃	OD at 450	Activity
Masterlot activity(제조시 활성)	–	–	3.51	100%
4℃	4	4	3.44	98%
	11	11	3.40	97%
	18	18	3.44	98%
	25	25	3.47	99%
25℃	4	20	3.37	96%
	11	55	3.40	97%
	18	90	3.30	94%
	25	125	3.40	97%
37℃	4	60	3.40	97%
	11	165	3.44	98%
	18	270	3.23	92%
	25	375	2.98	85%

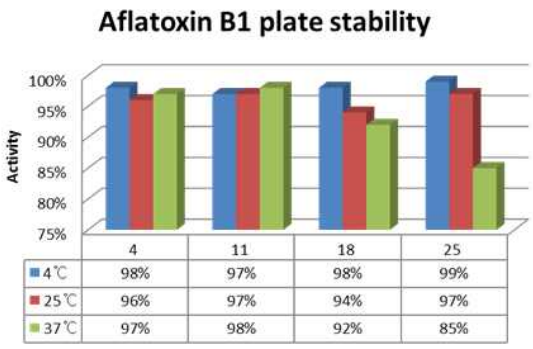


Plate stability test(Coated antibody stability)

Deoxynivalenol

Storage Temp	Storage period(days)	Equal to days at 4℃	OD at 450	Activity
Masterlot activity(제조시 활성)	–	–	3.37	100%
4℃	4	4	3.27	97%
	11	11	3.17	94%
	18	18	3.24	96%
	25	25	3.27	97%
25℃	4	20	3.10	92%
	11	55	3.17	94%
	18	90	3.10	92%
	25	125	3.13	93%
37℃	4	60	3.13	93%
	11	165	3.00	89%
	18	270	2.93	87%
	25	375	2.97	88%

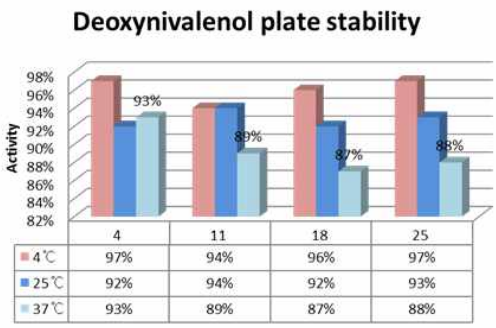


Plate stability test(Coated antibody stability)

Ochratoxin A

Storage Temp	Storage period(days)	Equal to days at 4℃	OD at 450	Activity
Masterlot activity(제조시 활성)	—	—	3.23	100%
4℃	4	4	3.17	98%
	11	11	3.13	97%
	18	18	3.17	98%
	25	25	3.20	99%
25℃	4	20	3.10	96%
	11	55	3.13	97%
	18	90	3.04	94%
	25	125	3.13	97%
37℃	4	60	2.97	92%
	11	165	2.81	87%
	18	270	2.75	85%
	25	375	2.84	88%

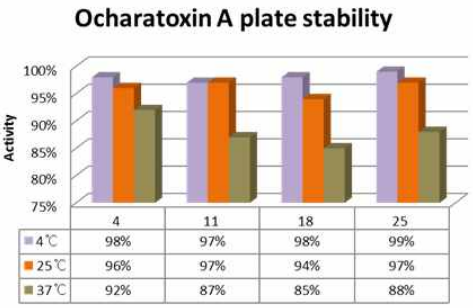


Plate stability test(Coated antibody stability)

Aflatoxin M1

Storage Temp	Storage period(days)	Equal to days at 4℃	OD at 450	Activity
Masterlot activity(제조시 활성)	—	—	3.12	100%
4℃	4	4	3.06	98%
	11	11	3.03	97%
	18	18	3.06	98%
	25	25	3.09	99%
25℃	4	20	3.00	96%
	11	55	3.03	97%
	18	90	2.93	94%
	25	125	3.03	97%
37℃	4	60	3.00	96%
	11	165	2.84	91%
	18	270	2.71	87%
	25	375	2.59	83%

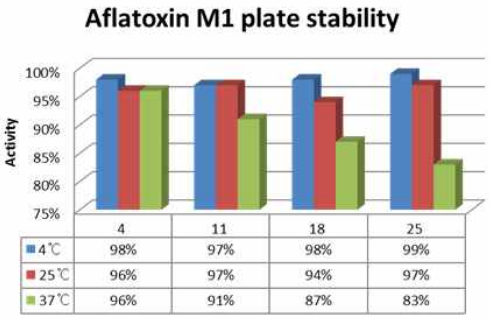


Plate stability test(Coated antibody stability)

T-2 toxin

Storage Temp	Storage period(days)	Equal to days at 4℃	OD at 450	Activity
Masterlot activity(제조시 활성)	—	—	3.43	100%
4℃	4	4	3.40	99%
	11	11	3.46	101%
	18	18	3.36	98%
	25	25	3.29	96%
25℃	4	20	3.33	97%
	11	55	3.22	94%
	18	90	3.12	91%
	25	125	3.19	93%
37℃	4	60	3.22	94%
	11	165	3.02	88%
	18	270	2.88	84%
	25	375	2.81	82%

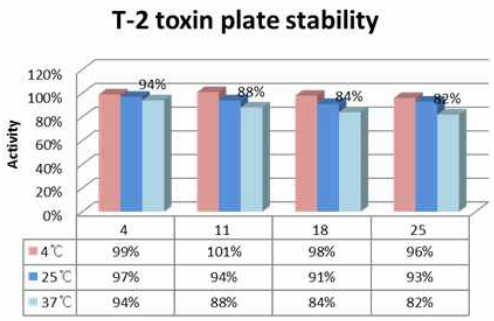
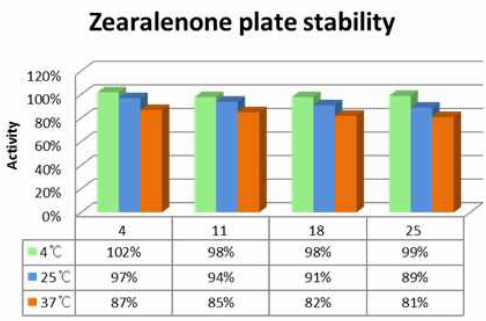


Plate stability test(Coated antibody stability)

Zearalenone

Storage Temp	Storage period(days)	Equal to days at 4℃	OD at 450	Activity
Masterlot activity(제조시 활성)	—	—	3.55	100%
4℃	4	4	3.62	102%
	11	11	3.48	98%
	18	18	3.48	98%
	25	25	3.51	99%
25℃	4	20	3.44	97%
	11	55	3.34	94%
	18	90	3.23	91%
	25	125	3.16	89%
37℃	4	60	3.09	87%
	11	165	3.02	85%
	18	270	2.91	82%
	25	375	2.88	81%



(바) 시제품 키트 안정성 평가

(1) 연구 방법

ㅇ 냉동시약을 제외한 제작된 kit를 4℃, 25℃, 37℃ 등 3가지 온도에서 보관하였으며, 4일, 11일, 18일, 25일 째 음성 시료에 각 마이코톡신 10ng/ml을 spiking하여 키트 사용법에 따라 실험을 진행하여 키트 제작시(MasterLot) Ct value을 기준으로 보관온도와 시간에 따른 활성도를 확인하였음.

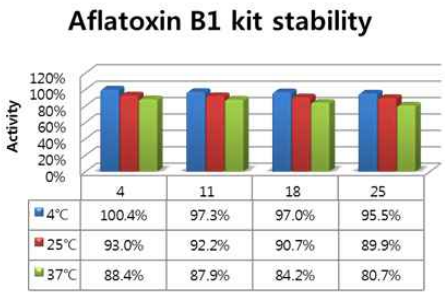
(2) 연구 결과

ㅇ 본 키트의 경우 4℃, 25℃, 37℃등 3가지 보관온도에서 모두 25일 동안 키트 활성을 확인하였다. 37℃에서 6종 키트 모두 80% 이상의 활성을 유지하여 4℃ 키트 보관온도로 환산했을 경우 375일, 즉 1년 이상의 키트활성을 유지하여 유효기간이 1년 이상으로 확인되었다. 냉동시약과 키트 보관온도인 4℃에서는 실제 키트의 안정성을 계속해서 확인할 계획이다.

그림 63. 시제품 키트 안정성 평가

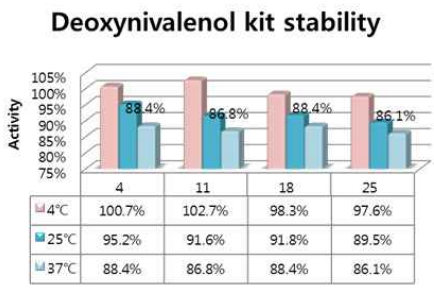
Aflatoxin B1 kit stability test

Storage Temp	Storage period(days)	Equal to days at 4℃	Real-Time PCR Ct values	Activity
Masterlot activity(제조시 활성)	–	–	25.47	100%
4℃	4	4	25.34	100.4%
	11	11	26.45	97.3%
	18	18	26.58	97.0%
	25	25	27.14	95.5%
25℃	4	20	28.12	93.0%
	11	55	28.45	92.2%
	18	90	29.12	90.7%
	25	125	29.47	89.9%
37℃	4	60	30.12	88.4%
	11	165	30.35	87.9%
	18	270	32.13	84.2%
	25	375	33.98	80.7%



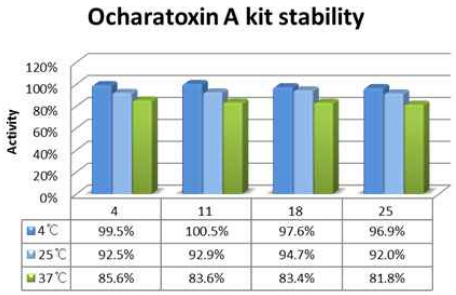
Deoxynivalenol kit stability test

Storage Temp	Storage period(days)	Equal to days at 4℃	Real-Time PCR Ct values	Activity
Masterlot activity(제조시 활성)	–	–	25.47	100%
4℃	4	4	25.34	100.7%
	11	11	26.45	102.7%
	18	18	26.58	98.3%
	25	25	27.14	97.6%
25℃	4	20	28.12	95.2%
	11	55	28.45	91.6%
	18	90	29.12	91.8%
	25	125	29.47	89.5%
37℃	4	60	30.12	88.4%
	11	165	30.35	86.8%
	18	270	32.13	88.4%
	25	375	33.98	86.1%



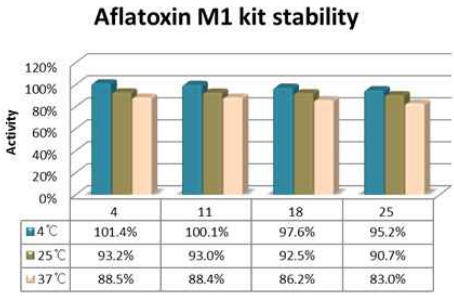
Ochratoxin A kit stability test

Storage Temp	Storage period(days)	Equal to days at 4℃	Real-Time PCR Ct values	Activity
Masterlot activity(제조시 활성)	—	—	26.9	100%
4℃	4	4	27.1	99.5%
	11	11	26.7	100.5%
	18	18	27.8	97.6%
	25	25	28.1	96.9%
25℃	4	20	29.9	92.5%
	11	55	29.74	92.9%
	18	90	28.95	94.7%
	25	125	30.12	92.0%
37℃	4	60	33.12	85.6%
	11	165	34.15	83.6%
	18	270	34.25	83.4%
	25	375	35.12	81.8%



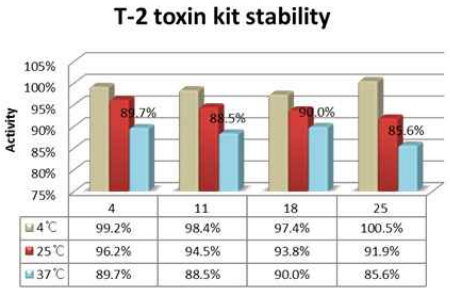
Aflatoxin M1kit stability test

Storage Temp	Storage period(days)	Equal to days at 4℃	Real-Time PCR Ct values	Activity
Masterlot activity(제조시 활성)	—	—	25.9	100%
4℃	4	4	25.40	101.4%
	11	11	25.87	100.1%
	18	18	26.80	97.6%
	25	25	27.70	95.2%
25℃	4	20	28.50	93.2%
	11	55	28.60	93.0%
	18	90	28.81	92.5%
	25	125	29.57	90.7%
37℃	4	60	30.58	88.5%
	11	165	30.59	88.4%
	18	270	31.65	86.2%
	25	375	33.25	83.0%



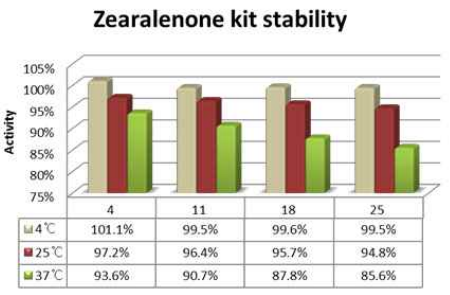
T-2 toxin kit stability test

Storage Temp	Storage period(days)	Equal to days at 4℃	Real-Time PCR Ct values	Activity
Masterlot activity(제조시 활성)	—	—	27.6	100%
4℃	4	4	27.9	99.2%
	11	11	28.2	98.4%
	18	18	28.6	97.4%
	25	25	27.4	100.5%
25℃	4	20	29.1	96.2%
	11	55	29.8	94.5%
	18	90	30.1	93.8%
	25	125	30.9	91.9%
37℃	4	60	31.9	89.7%
	11	165	32.5	88.5%
	18	270	31.8	90.0%
	25	375	33.9	85.6%



Zearalenone kit stability test

Storage Temp	Storage period(days)	Equal to days at 4℃	Real-Time PCR Ct values	Activity
Masterlot activity(제조시 활성)	—	—	28	100%
4℃	4	4	27.6	101.1%
	11	11	28.2	99.5%
	18	18	28.14	99.6%
	25	25	28.19	99.5%
25℃	4	20	29.1	97.2%
	11	55	29.4	96.4%
	18	90	29.7	95.7%
	25	125	30.1	94.8%
37℃	4	60	30.6	93.6%
	11	165	31.9	90.7%
	18	270	33.28	87.8%
	25	375	34.41	85.6%



(3) 키트의 안전성 연구

(가) 안전성 . 유효성 심사 관련 규정 조사

① 본 kit에 포함되어 있는 구성 시약 중 인체에 해를 끼칠 가능성이 있는 시약으로는 mycotoxin 표준물질이며 이 시약에 대한 안전서 연구가 필요하여 해당 관련 법규를 조사하였다.

② 관련규정

8) 약사법 제2조 (정의) ④항 : 의약품이라 함은 1. 대한약전(大韓藥典)에 실린 물품 중 의약외품이 아닌 것, 2. 사람이나 동물의 질병을 진단.치료.경감.처치 또는 예방할 목적으로 사용하는 물품 중 기구·기계 또는 장치가 아닌 것, 3. 사람이나 동물의 구조와 기능에 약리학적(藥理學的) 영향을 줄 목적으로 사용하는 물품 중 기구.기계 또는 장치가 아닌 것. <개정 1965.4.3, 1971.1.13, 2000.1.12>

9) 약사법 제42조 (의약품등의 수입허가 등) ⑤항 : 의약품등의 수입 품목을 허가할 때의 허가 대상·기준·조건 및 관리 등에 필요한 사항은 보건복지부령으로 정한다. <개정 1994.1.7, 1997.12.13>

10) 약사법시행규칙 제23조 (제조.수입품목의 허가신청 등) ①항 : 법 제26조 제1항 또는 법 제34조 제1항의 규정에 의하여 의약품등의 품목허가를 받고자 하는 자는 별지 제12호 서식에 의한 신청서(전자문서로 된 신청서를 포함한다)에 다음, 각호의 구분에 따른 서류(전자문서를 포함한다)를 첨부하여 식품의약품안전처장에게 제출하여야 한다. 나. 기준 및 시험방법 심사결과통지서로서 2년이 지나지 아니한 것, 마. 수입품의 경우, (1) 생산국의 정부 또는 공공기관에서 그 품목이 생산국의 법령에 적합하게 제조되고 있음을 증명하는 제조증명서, (2) 허가 또는 등록국의 정부 또는 공공기관에서 그 품목이 그 국가의 법령에 적합하게 판매되고 있음을 증명하는 판매증명서. <개정 2000.3.3, 2000.6.16, 2002.1.12, 2002.11.5, 2005.10.7>

11) 약사법시행규칙 제27조 (안전성.유효성의 심사) ①항 : 법 제34조 제5항의 규정에 의하여 의약품등의 품목허가 또는 품목변경허가를 받거나 품목신고 또는 품목변경신고를 하고자 하는 자는 다음 각호의 자료(전자문서를 포함한다)를 갖추어 그 품목에 대한 안전성·유효성의 심사를 받아야 한다. 이 경우 심사대상 품목, 자료작성요령, 각 자료의 요건 및 면제범위·심사기준 등에 관한 세부규정과 독성 및 약리작용 등에 관한 자료의 작성을 위하여 실시하는 비 임상시험의 관리에 필요한 사항은 식품의약품안전처장이 정하는 바에 의한다. <개정 1997.5.21, 2000.3.3, 2000.6.16, 2002.11.5, 2005.10.7.

12) 의약품·의약외품의 제조.수입품목 허가신청(신고)서 검토에 관한 규정 제2조 (정의) ①항 7호 : “체외진단용의약품”이라 함은 인체에서 유래하는 시료를 검체로 하여 검체중의 물질을 검출하거나 측정하여 인체의 질병감염 여부 등을 판정할 목적으로 사용되는 시약을 말하며, 통상 다른 기구 등(보조시약 포함)과의 조합에 의해 사용하는 경우(예 : 키트)를 포함한다. 다만, 체외진단용의약품을 실험실적으로 사용할 때 보조적 또는 부수적으로 사용되는 것으로서 그 자체만으로는 진단 등 목적으로 사용되지 아니하는 실험실적 조제시약, 반응전후 처리시약, 생화학자동분석기용 시약 등과 같은 보조시약

류는 제외한다. <식약청고시 제2007-18호, 2007.3.28.>

13) 의약품등의 안전성.유효성 심사에 관한 규정 제3조(심사규정) ①항 : 이 규정에 의한 의약품등의 안전성.유효성 심사는 약사법, 마약류 관리에 관한 법률에 의하여 제조 또는 수입품목허가(변경허가를 포함한다)를 받고자 하는 의약품등을 그 대상으로 한다. 다만, 다음, 각호의 어느 하나에 해당하는 경우는 제외한다. 3. 체외진단용의약품으로서 이미 허가된 바 있는 측정원리를 이용하는 품목(측정항목이 새로운 품목은 제외한다). <식약청고시 제2007-30호, 2007.5.25.>

14) 의약품등의 안전성.유효성 심사에 관한 규정 제5조(의약품등이 제출 자료의 범위) ③항 : 제1항의 규정에 불구하고 체외진단용의약품으로서 측정원리가 새로운 경우 또는 측정항목이 새로운 경우에는 다음 각호의 자료를 제출하여야 한다. 1. 개발경위, 측정원리 및 방법, 외국의 사용현황, 임상진단상의 의의에 관한 자료, 2. 용법.용량의 설정근거에 관한 자료, 3. 사용상의 주의사항 설정에 관한 자료, 4. 저장방법 및 사용기간의 설정에 관한 자료, 5. 시험결과에 대한 임상적 고찰, 6. 동일목적으로 사용되는 다른 체외진단용의약품과의 상관성에 관한 자료. <식약청고시 제2007-30호, 2007.5.25>

(3) Mycotoxin 검출 키트 safety data sheet 초안 작성

○ PRODUCT NAME: **Medexx Aflatoxin M_1, T-2 toxin, Zearalenone Immuno-PCR kit**

○ MANUFACTURER: Medexx co. Ltd.

○ DIVISION: Research and Development Center

○ Issue Date: 07/28/17

○ This product is a kit or a multipart product which consists of multiple, independently packaged components. An MSDS for each of these components is included. Please do not separate the component MSDSs from this cover page. The document numbers of the MSDSs for components of this product are: 22-8703-5, 22-9033-6, 22-8715-9, 22-9038-5, 22-9172-2, 22-8711-8, 22-8705-0, 22-8712-6, 22-8720-9

○ Use or application. Given the variety of factors that can affect the use and application of a Medexx product, some of which are uniquely within the user's knowledge and control, it is essential that the user evaluate the Medexx product to determine whether it is fit for a particular purpose and suitable for user's method of use or application. Medexx provides information in electronic form as a service to its customers. Due to the remote possibility that electronic transfer may have resulted in errors, omissions or alterations in this information, Medexx makes no representations as to its completeness or accuracy. In addition, information obtained from a database may not be as current as the information in the MSDS available ○ directly from Medexx.

○ EMERGENCY OVERVIEW

- Odor, Color, Grade: Colorless liquid
- General Physical Form: Liquid
- Immediate health, physical, and environmental hazards:

○ POTENTIAL HEALTH EFFECTS MATERIAL SAFETY DATA SHEET

- Eye Contact: Mild Eye Irritation: Signs/symptoms may include redness, pain, and tearing.
- Skin Contact: Mild Skin Irritation: Signs/symptoms may include localized redness, swelling, and itching.
- Inhalation: Respiratory Tract Irritation: Signs/symptoms may include cough, sneezing, nasal discharge, headache, hoarseness, and nose and throat pain. May be absorbed following inhalation and cause target organ effects.
- Ingestion: Gastrointestinal Irritation: Signs/symptoms may include abdominal pain, stomach upset, nausea, vomiting and diarrhea. May be absorbed following ingestion and cause target organ effects.
- Target Organ Effects: Prolonged or repeated exposure may cause:
- Liver Effects: Signs/symptoms may include loss of appetite, weight loss, fatigue, weakness, abdominal tenderness and jaundice.
- Kidney/Bladder Effects: Signs/symptoms may include changes in urine production, abdominal or lower back pain, increased protein in urine, increased blood urea nitrogen (BUN), blood in urine, and painful urination.

○ FIRST AID PROCEDURES

- The following first aid recommendations are based on an assumption that appropriate personal and industrial hygiene practices are followed.
- Eye Contact: Flush eyes with large amounts of water. If signs/symptoms persist, get medical attention.
- Skin Contact: Wash affected area with soap and water. If signs/symptoms develop, get medical attention.
- Inhalation: Remove person to fresh air. If signs/symptoms develop, get medical attention. If Swallowed: Do not induce vomiting unless instructed to do so by medical personnel. Give victim two glasses of water. Never give anything by mouth to an unconscious person. Get medical attention.

○ FLAMMABLE PROPERTIES

- Autoignition temperature Not Applicable
- Flash Point Not Applicable
- Flammable Limits - LEL Not Applicable
- Flammable Limits - UEL Not Applicable

○ EXTINGUISHING MEDIA

- Material will not burn. Use fire extinguishers with class B extinguishing agents (e.g., dry chemical, carbon dioxide).

○ PROTECTION OF FIRE FIGHTERS

- Special Fire Fighting Procedures: Wear full protective equipment (Bunker Gear) and a self-contained breathing apparatus
- Unusual Fire and Explosion Hazards: Not applicable.
- Note: See STABILITY AND REACTIVITY (SECTION 10) for hazardous combustion and thermal decomposition information.

○ Personal precautions

- Evacuate unprotected and untrained personnel from hazard area. The spill should be cleaned up by qualified personnel. Ventilate the area with fresh air. For large spill, or spills in confined spaces, provide mechanical ventilation to disperse or exhaust vapors, in accordance with good industrial hygiene practice. Warning! A motor could be an ignition source and could cause flammable gases or vapors in the spill area to burn or explode. Remember, adding an absorbent material does not remove a toxic, corrosivity or flammability hazard.

○ Environmental procedures

- For larger spills, cover drains and build dikes to prevent entry into sewer systems or bodies of water. Collect the resulting residue containing solution. Place in a metal container approved for transportation by appropriate authorities. Dispose of collected material as soon as possible.

○ Clean-up methods

- Refer to other sections of this MSDS for information regarding physical and health hazards, respiratory protection, ventilation, and personal protective equipment. Call Medexx-HELPS line (1-800-364-3577) for more information on handling and managing the spill. Contain spill. Working from around the edges of the spill inward, cover with bentonite, vermiculite, or commercially available inorganic absorbent material. Mix in sufficient absorbent until it appears dry. Collect as much of the spilled material as possible. Clean up residue with an appropriate solvent selected by a qualified and authorized person. Ventilate the area with fresh air. Read and follow safety precautions on the solvent label and MSDS. In the event of a release of this material, the user should determine if the release qualifies as reportable according to local, state, and federal regulations.

○ HANDLING

- Avoid eye contact. Do not eat, drink or smoke when using this product. Wash exposed areas thoroughly with soap and water. Avoid breathing of vapors, mists or spray. Avoid skin contact. Use general dilution ventilation and/or local exhaust ventilation to control airborne exposures to below Occupational Exposure Limits. If ventilation is not adequate, use respiratory protection equipment.

○ STORAGE

- Store in a cool place.

○ ENGINEERING CONTROLS

- Use with appropriate local exhaust ventilation. Use general dilution ventilation and/or local exhaust ventilation to control airborne exposures to below Occupational Exposure Limits and/or control mist, vapor, or spray. If ventilation is not adequate, use respiratory protection equipment.

○ Eye/Face Protection

- Avoid eye contact. The following eye protection(s) are recommended: Safety Glasses with side shields

○ Skin Protection

- Avoid skin contact. Select and use gloves and/or protective clothing to prevent skin

contact based on the results of an exposure assessment. Consult with your glove and/or protective clothing manufacturer for selection of appropriate compatible materials. Gloves made from the following material(s) are recommended: Nitrile Rubber Selection and use of gloves is recommended to prevent skin contact.

○ Respiratory Protection

- Under normal use conditions, airborne exposures are not expected to be significant enough to require respiratory protection. Avoid breathing of vapors, mists or spray.

○ Prevention of Swallowing

- Do not eat, drink or smoke when using this product. Wash exposed areas thoroughly with soap and water. Not applicable.

○ PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES

- General Physical Form: Liquid
- Autoignition temperature Not Applicable
- Flash Point Not Applicable
- Flammable Limits - LEL Not Applicable
- Flammable Limits - UEL Not Applicable
- Boiling point No Data Available
- Density No Data Available
- Vapor Density No Data Available
- Vapor Pressure No Data Available
- Specific Gravity >= 1
- pH No Data Available
- Melting point No Data Available
- Solubility In Water Not Applicable
- Evaporation rate No Data Available
- Hazardous Air Pollutants 0.005 - 0.01 % weight
- Volatile Organic Compounds 0
- Kow - Oct/Water partition coef No Data Available
- Percent volatile 0
- VOC Less H2O & Exempt Solvents 0
- Viscosity No Data Available

○ TOXICOLOGICAL INFORMATION

- Please contact the address listed on the first page of the MSDS for Toxicological Information on this material and/or its components.

○ ECOLOGICAL INFORMATION

○ CHEMICAL FATE INFORMATION

○ DISPOSAL CONSIDERATIONS

- Waste Disposal Method: Dispose of waste product in a permitted hazardous waste facility.
- EPA Hazardous Waste Number (RCRA): D009 (Mercury)
- Since regulations vary, consult applicable regulations or authorities before disposal.

○ Fire Hazard - No Pressure Hazard - No Reactivity Hazard - No Immediate

Hazard - Yes Delayed Hazard - Yes

○ SECTION 16: OTHER INFORMATION

- NFPA Hazard Classification
- Health: 2 Flammability: 0 Reactivity: 0 Special Hazards: None
- National Fire Protection Association (NFPA) hazard ratings are designed for use by emergency response personnel to address the hazards that are presented by short-term, acute exposure to a material under conditions of fire, spill, or similar emergencies. Hazard ratings are primarily based on the inherent physical and toxic properties of the material but also include the toxic properties of combustion or decomposition products that are known to be generated in significant quantities.
- Reason for Reissue: Updated waste disposal section.

제 3 절 Mycotoxin 진단키트의 유효성 평가

1. 진단키트의 유효성 평가

가. 민감도 평가 및 검출한계

(1) 시험 방법

○ Aflatoxin B_1, Deoxynivalenol, Ochratoxin A, Aflatoxin M_1, Zearalenone, T-2 toxin 각각의 곰팡이독소 민감도를 아래와 같이 확인하였다. 각 독소의 표준물질을 100㎕씩 각각 100개의 진단 kit에 적용 후 아래와 같은 공식을 적용하여 결과를 산출하였다.

○ 상용화되어 판매되고 있는 표준원액을 사용하여 각각 PBS에 넣어 100ug/mL를 조제하였다. 이것을 원액으로 희석하여 곰팡이독소 (Aflatoxin B_1, Deoxynivalenol, Ochratoxin A, Aflatoxin M_1, Zearalenone, T-2 toxin) 각각 1ug, 100ng, 10ng, 1ng 100pg, 10pg, 1pg으로 희석하여 수행하였다.

- 양성 표준물질을 100㎕씩 각기 30개의 진단 kit에 적용 후 아래와 같은 공식을 적용하여 결과를 산출하였다.

민감도 = (양성반응 kit 수 / 양성반응 kit 수 + 음성반응 kit 수) × 100 (%)

○ 각각의 Aflatoxin B_1 immuno-PCR kit, Deoxynivalenol immuno-PCR kit, Ochratoxin A immuno-PCR kit, Aflatoxin M_1 immuno-PCR kit, Zearalenone immuno-PCR kit그리고 T-2 toxin immuno-PCR kit의 민감도 시험수행 하였다.

- Aflatoxin B_1 immuno-PCR kit, Deoxynivalenol immuno-PCR kit의 경우. 1 pg/mL에서 90% 이상의 민감도를 나타내어 1 pg 까지도 확인되어1 pg/mL의 검출한계(The limits of Detection, LOD)를 나타내었으며, Deoxynivalenol immuno-PCR kit의 경우에도 1 pg/mL의 LOD를 보였다. 또한 Ochratoxin A immuno-PCR kit의 경우에도 1 pg/mL에서 89%의 민감도가 나타났다.

○ Zearalenone kit, T-2 toxin kit 의 경우에도 1 pg/ml에서 88.9%, 82.1%의 민감도를 보였다. 특히 우유, 치즈 등의 유제품에서 검출되는 Aflatoxin M_1 kit는 1 pg/ml(g)에서 83.2%를 나타냈다.

○ **검출한계(The limits of Detection (LOD))**

- Aflatoxin B_1 immuno-PCR kit, Deoxynivalenol immuno-PCR kit, Ochratoxin immuno-PCR kit, Aflatoxin M_1 immuno-PCR kit, Zearalenone immuno-PCR kit 그리고 T-2 toxin immuno-PCR kit 검출한계는 Table에서 나타난바와 같이 1pg/mL까지 검출될 수 있는 것으로 나타났다.

- 모든 종류의 mycotoxin에 대한 검출 민감도가 1 pg 농도에서 80% 이상을 나타냄으로써 1 pg 농도에서도 안정적으로 검출할 수 있음을 알 수 있었다. 그런데도 민감도가 100%에 미치지 못하는 것은 소량의 DNA template의 recovery rate이 100%에 미치지 못하기 때문인 것으로 예상된다. 그러한 이유로는 restriction enzyme의 작용이 모

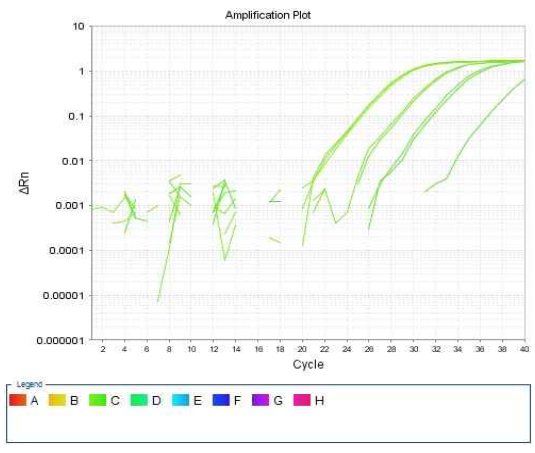
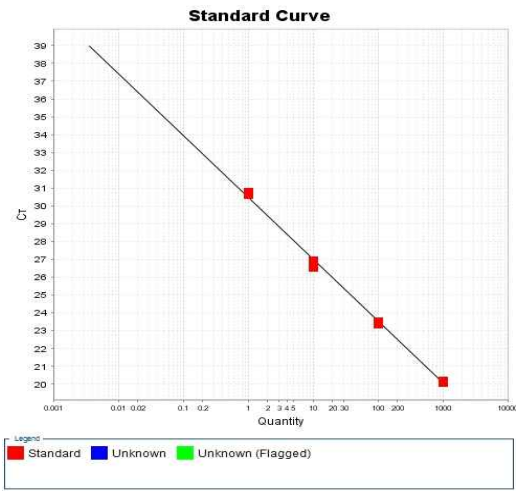
든 DNA 사슬을 잘라내지 못했거나, 소량의 DNA와 coating 및 real-time PCR tube 표면과의 소수성 반응을 통하여 tube 표면에 흡착된 DNA가 적절히 회수되지 않았거나, PCR 반응에서 template로 작용하지 못한 것으로 예상된다. 따라서 이러한 부분을 고려하여 반응 tube 들을 제작한다면 1 pg에서도 안정적으로 검출이 가능할 것으로 예상된다.

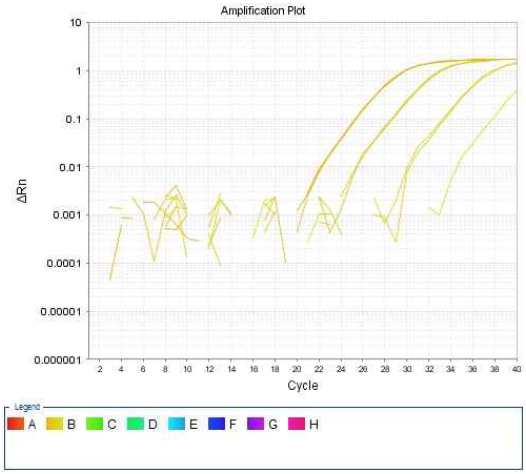
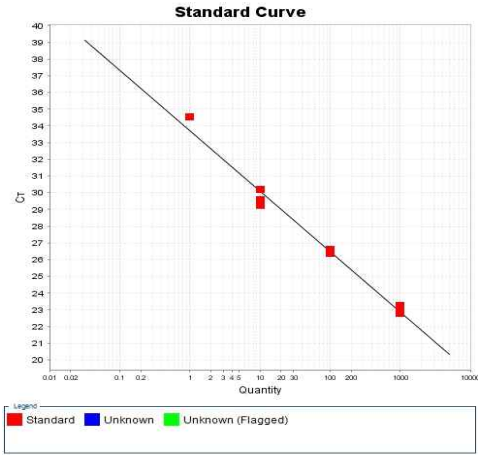
표 9. Immuno-PCR kit의 민감도 및 검출한계

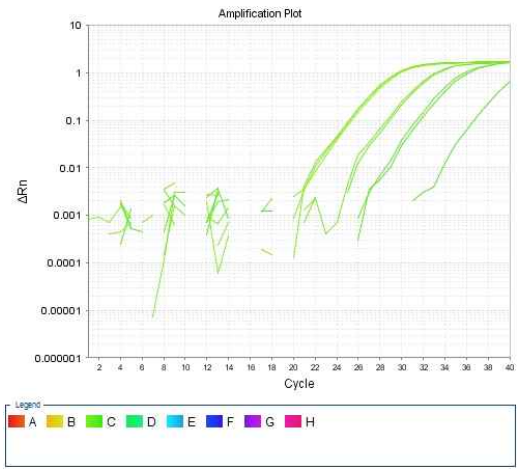
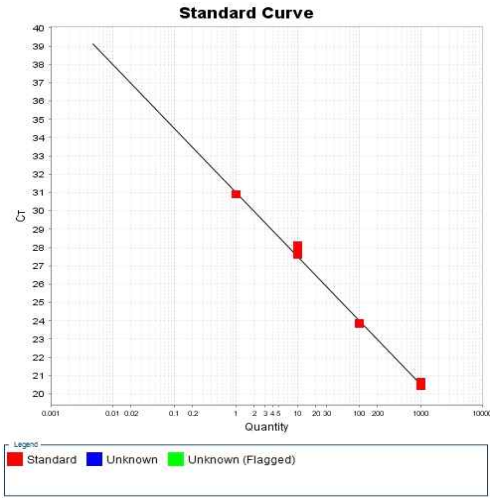
Aflatoxin B_1 kit		Deoxynivalenol kit		Ochratoxin kit	
Aflatoxin 농도	민감도 (%)	Deoxynivalenol 농도	민감도 (%)	Ochratoxin 농도	민감도 (%)
1 ug/ml	100.0	1 ug/ml	100.0	1 ug/ml	100.0
10 ng/ml	100.0	10 ng/ml	100.0	10 ng/ml	100.0
100 pg/ml	96.8	100 pg/ml	92.3	100 pg/ml	93.1
1 pg/ml	95.7	1 pg/ml	92.7	1 pg/ml	89.0

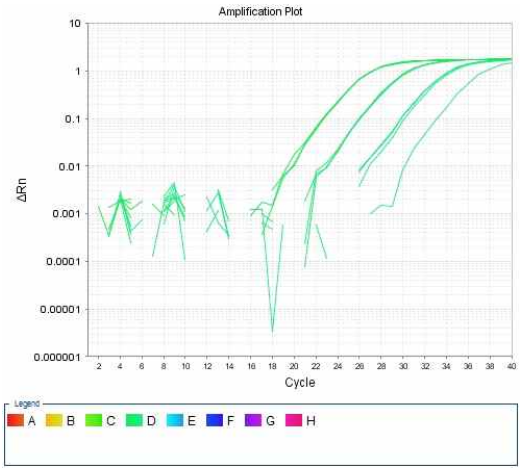
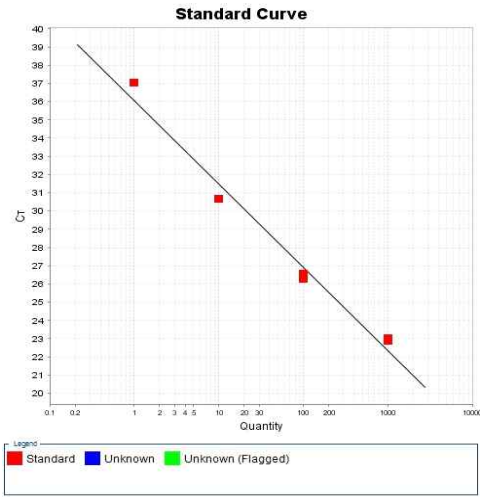
표 10. Immuno-PCR kit의 민감도 및 검출한계

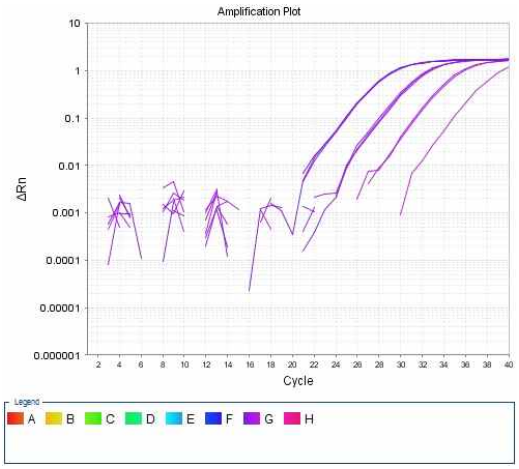
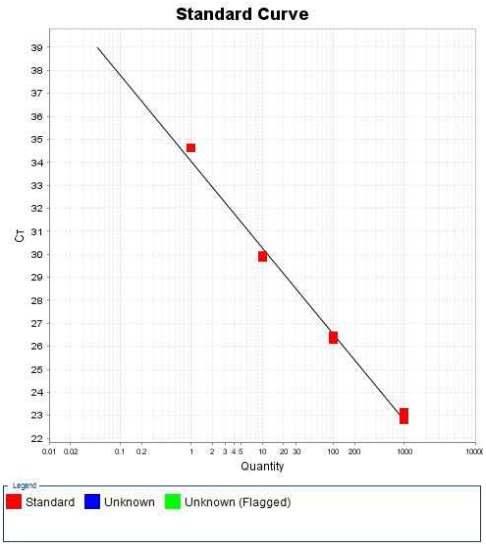
Aflatoxin M_1 kit		Zearalenone kit		T-2 toxin kit	
Aflatoxin M_1 농도	민감도 (%)	Zearalenone 농도	민감도 (%)	T-2 toxin 농도	민감도 (%)
1 ug/ml	100.0	1 ug/ml	100.0	1 ug/ml	100.0
10 ng/ml	100.0	10 ng/ml	100.0	10 ng/ml	100.0
100 pg/ml	95.6	100 pg/ml	92.2	100 pg/ml	88.6
1 pg/ml	83.2	1 pg/ml	88.9	1 pg/ml	82.1

Aflatoxin B_1 Immuno-PCR kit	
Amplication Plot	Standard Curve
	

Ochratoxin A Immuno-PCR kit	
Amplication Plot	Standard Curve
	

Zearalenon Immuno-PCR kit	
Amplication Plot	Standard Curve
	

Deoxynivalenol Immuno-PCR kit	
Amplication Plot	Standard Curve
	

T-2 Toxin Immuno-PCR kit	
Amplication Plot	Standard Curve
	

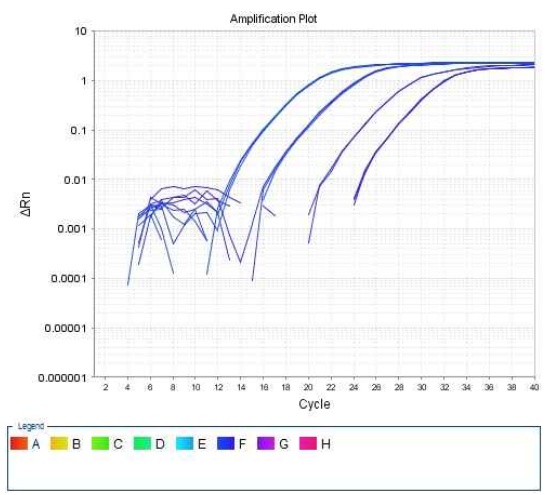
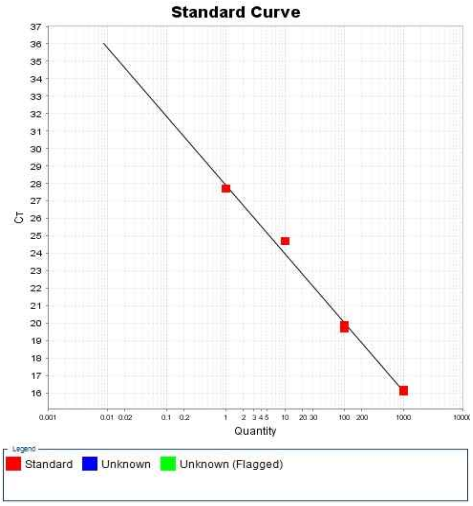
Aflatoxin M_1 Immuno-PCR kit	
Amplication Plot	Standard Curve
	

그림 64. Immuno-PCR kit의 민감도 Realtime PCR 결과

나. 특이도 평가

○ 각각의 진단키트가 각장의 표준독소에 특이성이 있는지를 파악하기 위하여 Aflatoxin B_1, Deoxynivalenol, Ochratoxin A, T-2 toxin, Aflatoxin M_1, Zearalenone, *S. aureus* enterotoxin A, *S. aureus* enterotoxin B, *S. aureus* enterotoxin H, *C. perfringens* CPA toxins, *E. coli* shigatoxin의 10 ng/ml와 독소와의 교차반응을 조사하였다. 특히 곰팡이 독소 외에 식품위생법상 식중독을 일으키는 대표적인 *S. aureus, C. perfringens, E. coli*의 장독소를 포함하여 확인하였다.

- 음성 표준물질을 100㎕씩 각기 100개의 진단 kit에 적용 후 아래와 같은 공식을 적용하여 결과를 산출하였다.

특이도 = (음성반응 kit 수 / 양성반응 kit 수 + 음성반응 kit 수) × 100(%)

○ 특이도 결과

- Aflatoxin B_1 kit의 경우에는 Aflatoxin B_1에만 반응을 나타내었으며, Deoxynivalenol kit에서는 Deoxynivalenol 만 반응이, Ochratoxin kit에는 Ochratoxin만 반응성이 나타났다. 다른 곰팡이 독소인 T-2 toxin, Aflatoxin M_1, Zearalenone에서도 양성반응이 나오지 않았으며, 세균성 독소인 *S. aureus* enterotoxin A, *S. aureus* enterotoxin B, *S. aureus* enterotoxin H, *C. perfringens* CPA toxins, *E. coli* shigatoxin에서도 양성반응이 없어 특이성이 매우 높은 것으로 나타났다.

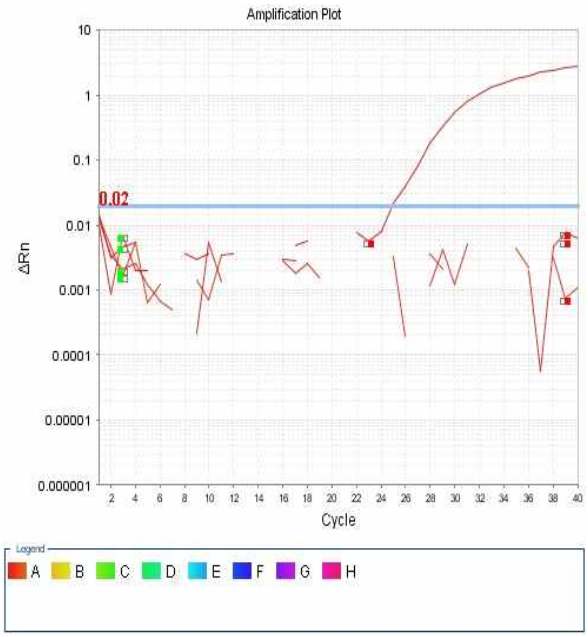
- 또한 Aflatoxin M_1 immuno-PCR kit, Zearalenone immuno-PCR kit 그리고 T-2 toxin immuno-PCR kit의 경우에도 각각의 독소에만 100% 반응하는 것으로 나타나 높은 특이성을 보였다(Table 및 그림 참조).

표 11. Immuno-PCR kit의 특이도 결과

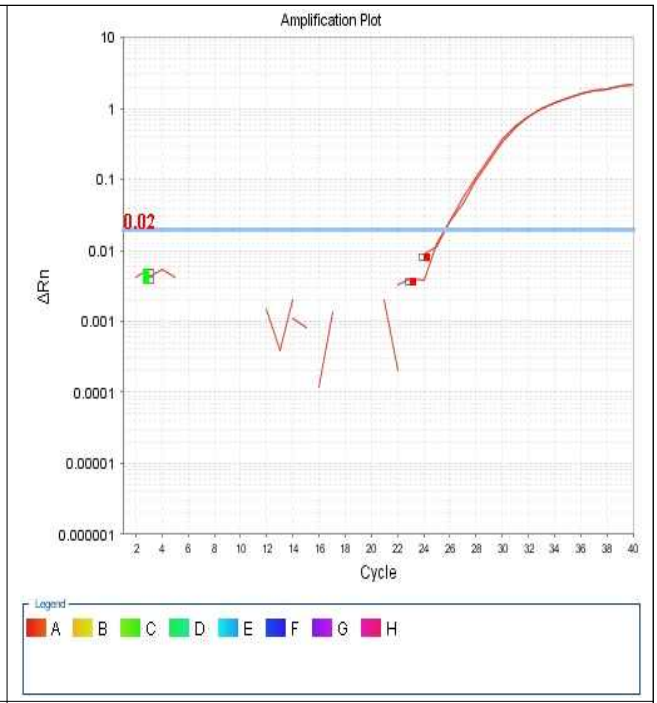
Aflatoxin B_1 Immuno-PCR kit		**Deoxynivalenol Immuno-PCR kit**		**Ochratoxin Immuno-PCR kit**	
음성표준물질	특이도 (%)	음성표준물질	특이도 (%)	음성표준물질	특이도 (%)
Aflatoxin B_1 10 ng/ml	100.0	Deoxynivalenol 10 ng/ml	100.0	Ochratoxin 10 ng/ml	100.0
Deoxynivalenol 10 ng/ml	<0.1	Aflatoxin B_1 10 ng/ml	<0.1	Aflatoxin B_1 10 ng/ml	<0.1
Ochratoxin A 10 ng/ml	<0.1	Ochratoxin A 10 ng/ml	<0.1	Deoxynivalenol 10 ng/ml	<0.1
T-2 toxin 10 ng/ml	<0.1	T-2 toxin 10 ng/ml	<0.1	T-2 toxin 10 ng/ml	<0.1
Aflatoxin M_1 10 ng/ml	<0.1	Aflatoxin M_1 10 ng/ml	<0.1	Aflatoxin M_1 10 ng/ml	<0.1
Zearalenone 10 ug/ml	<0.1	Zearalenone 10 ug/ml	<0.1	Zearalenone 10 ug/ml	<0.1
S. aureus enterotoxin A 10 ug/ml	<0.1	*S. aureus* enterotoxin A 10 ug/ml	<0.1	*S. aureus* enterotoxin A 10 ug/ml	<0.1
S. aureus enterotoxin B 10 ug/ml	<0.1	*S. aureus* enterotoxin B 10 ug/ml	<0.1	*S. aureus* enterotoxin B 10 ug/ml	<0.1
S. aureus enterotoxin H 10 ug/ml	<0.1	*S. aureus* enterotoxin H 10 ug/ml	<0.1	*S. aureus* enterotoxin H 10 ug/ml	<0.1
C. perfringens CPA toxins 10 ug/ml	<0.1	*C. perfringens* CPA toxins 10 ug/ml	<0.1	*C. perfringens* CPA toxins 10 ug/ml	<0.1
E. coli O157 shigatoxin 10 ug/ml	<0.1	*E. coli* O157 shigatoxin 10 ug/ml	<0.1	*E. coli* O157 shigatoxin 10 ug/ml	<0.1

표 12. Immuno-PCR kit의 특이도 결과

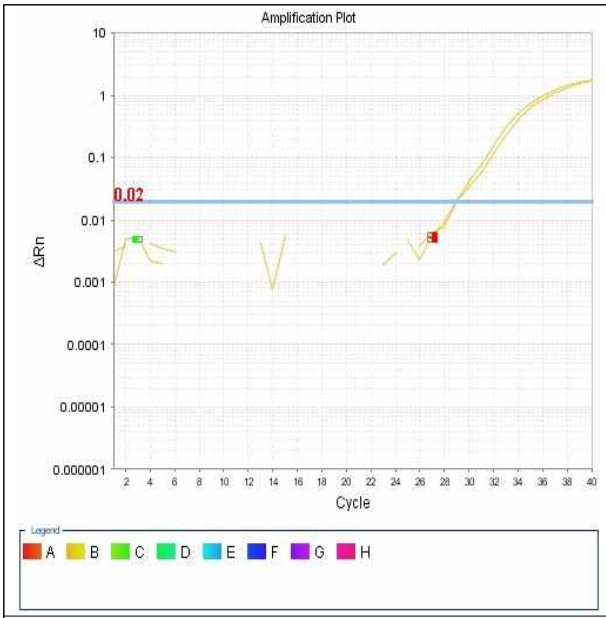
Aflatoxin M_1 Immuno-PCR kit		Zearalenone Immuno-PCR kit		T-2 toxin Immuno-PCR kit	
음성표준물질	특이도 (%)	음성표준물질	특이도 (%)	음성표준물질	특이도 (%)
Aflatoxin M_1 10 ng/ml	100.0	Zearalenone 10 ng/ml	100.0	T-2 toxin 10 ng/ml	100.0
Deoxynivalenol 10 ng/ml	<0.1	Aflatoxin B_1 10 ng/ml	<0.1	Aflatoxin B_1 10 ng/ml	<0.1
Ochratoxin A 10 ng/ml	<0.1	Ochratoxin A 10 ng/ml	<0.1	Deoxynivalenol 10 ng/ml	<0.1
T-2 toxin 10 ng/ml	<0.1	T-2 toxin 10 ng/ml	<0.1	Ochratoxin A 10 ng/ml	<0.1
Aflatoxin B_1 10 ng/ml	<0.1	Aflatoxin M_1 10 ng/ml	<0.1	Aflatoxin M_1 10 ng/ml	<0.1
Zearalenone 10 ng/ml	<0.1	Deoxynivalenol 10 ng/ml	<0.1	Zearalenone 10 ng/ml	<0.1
S. aureus enterotoxin A 10 ng/ml	<0.1	*S. aureus* enterotoxin A 10 ng/ml	<0.1	*S. aureus* enterotoxin A 10 ng/ml	<0.1
S. aureus enterotoxin B 10 ng/ml	<0.1	*S. aureus* enterotoxin B 10 ng/ml	<0.1	*S. aureus* enterotoxin B 10 ng/ml	<0.1
S. aureus enterotoxin H 10 ng/ml	<0.1	*S. aureus* enterotoxin H 10 ng/ml	<0.1	*S. aureus* enterotoxin H 10 ng/ml	<0.1
C. perfringens CPA toxins 10 ng/ml	<0.1	*C. perfringens* CPA toxins 10 ng/ml	<0.1	*C. perfringens* CPA toxins 10 ng/ml	<0.1
E. coli O157 shigatoxin 10 ng/ml	<0.1	*E. coli* O157 shigatoxin 10 ng/ml	<0.1	*E. coli* O157 shigatoxin 10 ng/ml	<0.1



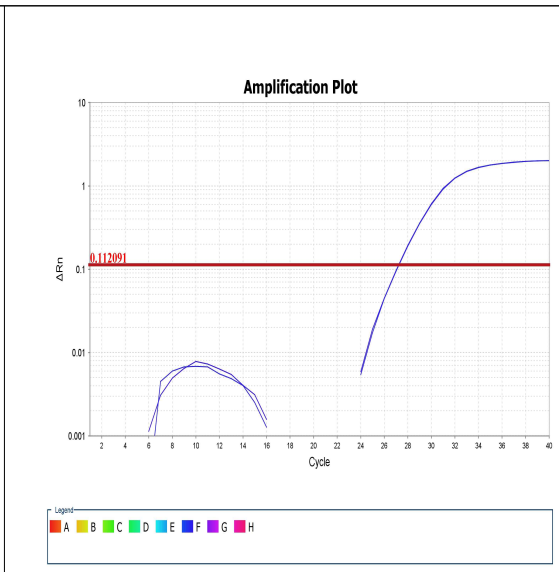
Aflatoxin B_1 Immuno-PCR kit



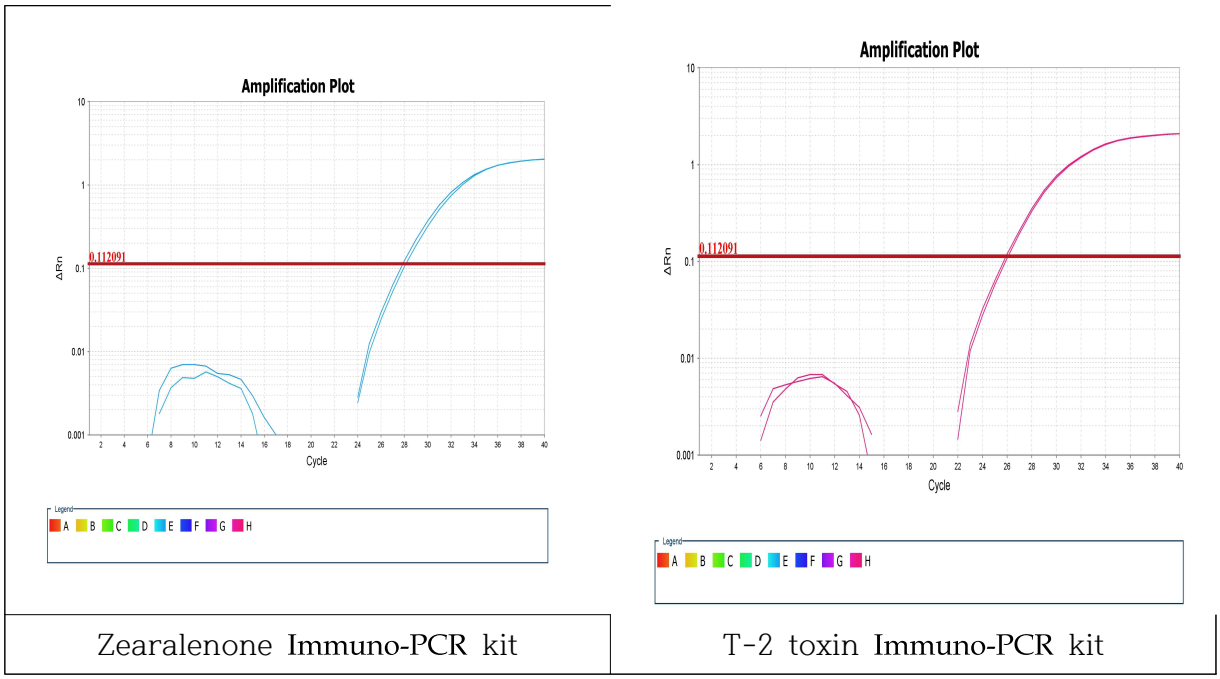
Ochratoxin A Immuno-PCR kit



Deoxynivalenol Immuno-PCR kit



Aflatoxin M_1 Immuno-PCR kit



Zearalenone Immuno-PCR kit	T-2 toxin Immuno-PCR kit

그림 65. Immuno-PCR kit의 특이도 Realtime PCR 결과

다. Mycotoxigenic fungi 추출물에 포함된 mycotoxin의 교차반응 조사

○ 본 과제에서 개발한 메덱스 Aflatoxin B_1, Deoxynivalenol, Ochratoxin A, Aflatoxin M_1, Zearalenone, T-2 Toxin Immuno-PCR kit 및 대표적인 곰팡이독소 진단키트로 알려진 Romer 제품 및 perkin-elmer 자회사인 BIOO 회사 제품을 대조군으로 mycotoxin producing 표준균주(*Aspergillus flavus, A. niger, A. ochraceus* 등), mycotoxin non producing 표준균주(*Fusarium moniliforme* KACC 40386 등 3 균주) 및 독소 발생 세균(11 균주) 및 기타 균의 독소가 포함된 추출물을 대상으로 교차 반응에 대하여 확인하였다.

- 곰팡이 균주를 Petridish에 Potato dextrose agar 25℃, 10일 동안 배양한 다음 0.85% 멸균 생리식염수 1mL를 넣은 다음 멸균된 스프레더를 넣고 충분히 균사, 포자 및 곰팡이 독소가 나올 수 있도록 10분간 문지른 다음 추출물을 1mL 파이펫 팁으로 모아 1.5mL eppendorf tube에 넣는다. 이것을 5,000rpm에서 3분간 원심 분리한 다음 상층액을 다시 1.5mL eppendorf tube에 넣어 4℃ 냉장고에 넣어 보관한다.

- 세균의 균주(*Salmonella enteritidis ATCC 13076, Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Esherichia coli O157:H7* ATCC 43888, *Esherichia coli O157:H7* ATCC 43890, *Esherichia coli* ATCC 25922, *Shigella dysenteriae* ATCC 13313, *Citrobacter freundii* ATCC 6750, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923)는 buffered pepton water, tryptic soy broth에 접종한 다음 37℃, 3일간 배양한 다음 13,000rpm에서 3분간 원심분리한 다음 세균 을 제거한 다음 상층액을 다시 1.5mL eppendorf tube에 넣어 4℃ 냉장고에 넣어 보관한 다음, 위의 상층액 100uL을 대상으로 개발한 mycotoxin immuno assay kit에 적용하여 교차반응을 조사하였다(표 참조).

○ 또한 곰팡이 독소의 대표적인 진단키트인 외국산 Romer 제품과 비교 분석하여 본 과제의

진단키트와의 비교를 확인하여 보았다. 외국산 Romer 제품은 AOAC international 에 등재된 제품이며, BIOO scientific 회사의 제품은 Perkinelmer 자회사로 ISO 9001:2008 의 국제 규격방법으로 만들어진 제품으로 그 결과에 대한 신뢰성을 담보하고 있는 제품이다.

- Aflatoxin B_1 Immuno-PCR kit의 경우에는 Aflatoxin 생성균주인 *Aspergillus flavus* KACC 46449, *Aspergillus flavus* KACC 44986, *Aspergillus parasiticus* KACC 46037, *Aspergillus parasiticus* KACC 46901 등의 추출물에서만 확인이 되었다.

- Deoxynivalenol Immuno-PCR kit의 경우, Deoxynivalenol 및 Zearalenon의 동시 생성균주인 *Fusarium graminearum* Schwabe KACC 41042, *Fusarium graminearum* Schwabe KACC 41044 등의 추출물에서만 검출되었고, Ochratoxin Immuno-PCR kit의 경우에는 *Aspergillus ochraceus* Wilhelm KACC 45186, *Aspergillus carbonarius* Thom KACC 45070 균주의 추출물에서 확인이 되었다. 나머지 mycotoxin non producing 균주 및 장독소 생성균주에는 반응을 보이지 않았다.

- Aflatoxin M_1 Immuno-PCR kit는 균주 추출물로 하지 않고 표준품으로 교차반응을 확인하였으며, 메덱스 등 모두 키트에서 양성반응을 확인할 수 있었다. Zearalenon Immuno-PCR kit의 경우, Zearalenon 및 Deoxynivalenol의 생성균주인 *Fusarium graminearum* Schwabe KACC 41042, *Fusarium graminearum* Schwabe KACC 41044의 추출물에서 확인이 되었으며, T-2 Toxin Immuno-PCR kit에서는 *Fusarium sporotrichioides* 추출물에서 반응이 되었고 나머지 추출물 등에서는 검출되지 않았다.

표 13. 교차반응 및 외국산 키트와 비교

균주의 추출물	검사 키트에 따른 결과								
	Aflatoxin B_1			Deoxynivalenol			Ochratoxin		
	메덱스	Romer	BIOO	메덱스	Romer	BIOO	메덱스	Romer	BIOO
Aspergillus flavus KACC 46449	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Aspergillus flavus KACC 44986	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Aspergillus ochraceus Wilhelm KACC 45186	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Aspergillus carbonarius Thom KACC 45070	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Aspergillus parasiticus Speare KACC 46037	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Aspergillus parasiticus Speare KACC 46901	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Penicillium expansum Link KACC 40816	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fusarium verticillioides (Sacc.) Nirenberg KACC 45825	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fusarium graminearum Schwabe KACC 41042	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Fusarium graminearum Schwabe KACC 41044	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Fusarium culmorum KACC 43800	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Fusarium moniliforme KACC 40386	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fusarium tricinctum (Corda) Saccardo KACC 42097	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fusarium proliferatum KACC 40387	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fusarium sporotrichioides Sherb. KACC 43804	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fusarium proliferatum KACC 40387	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Penicillium roqueforti KACC 45925	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salmonella enteritidis ATCC 13076	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Listeria monocytogenes ATCC 15313	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esherichia coli O157:H7 ATCC 43888	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esherichia coli O157:H7 ATCC 43890	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esherichia coli ATCC 25922	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Shigella dysenteriae ATCC 13313	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrobacter freundii ATCC 6750	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Staphylococcus aureus ATCC 25923	-	-	-	-	-	-	-	-	-

표 14. 교차반응 및 외국산 키트와 비교

균주의 추출물	검사 키트에 따른 결과								
	Aflatoxin M_1			Zearalenon			T-2 Toxin		
	메텍스	Romer	BIOO	메텍스	Romer	BIOO	메텍스	Romer	BIOO
Aflatoxin M_1 표준품	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Aspergillus flavus KACC 44986	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aspergillus ochraceus Wilhelm KACC 45186	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aspergillus carbonarius Thom KACC 45070	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aspergillus parasiticus Speare KACC 46037	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Aspergillus parasiticus Speare KACC 46901	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Penicillium expansum Link KACC 40816	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fusarium verticillioides (Sacc.) Nirenberg KACC 45825	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fusarium graminearum Schwabe KACC 41042	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Fusarium graminearum Schwabe KACC 41044	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Fusarium culmorum KACC 43800	-	-	-	+	-	+	-	-	-
Fusarium moniliforme KACC 40386	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fusarium tricinctum (Corda) Saccardo KACC 42097	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fusarium proliferatum KACC 40387	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fusarium sporotrichioides	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Fusarium proliferatum KACC 40387	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Penicillium roqueforti KACC 45925	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salmonella enteritidis ATCC 13076	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Listeria monocytogenes ATCC 15313	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esherichia coli O157:H7 ATCC 43888	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esherichia coli O157:H7 ATCC 43890	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esherichia coli ATCC 25922	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Shigella dysenteriae ATCC 13313	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrobacter freundii ATCC 6750	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Staphylococcus aureus ATCC 25923	-	-	-	-	-	-	-	-	-

라. Mycotoxin을 인위적으로 접종한 식품을 이용한 유효성평가

(1) 곰팡이독소 표준품의 인위적으로 접종

○ 상용화되어 판매되고 있는 표준원액을 사용하여 각각 희석시켜 100ug/mL를 조제하였다. 이것을 원액으로 희석하여 곰팡이 독소 (Aflatoxin B_1, Deoxynivalenol, Ochratoxin A, Aflatoxin M_1 , Zearalenone, T-2 toxin) 각각 100ng을 시료에 접종하였다.

- 시료는 크게 곡류, 견과류, 동물사료, 가공품으로 상세히는 옥수수, 귀리, 호두, 땅콩, 단미사료, 배합사료, 커피원두, 밀가루, 된장으로 분류하여 평가에 적용하였다.

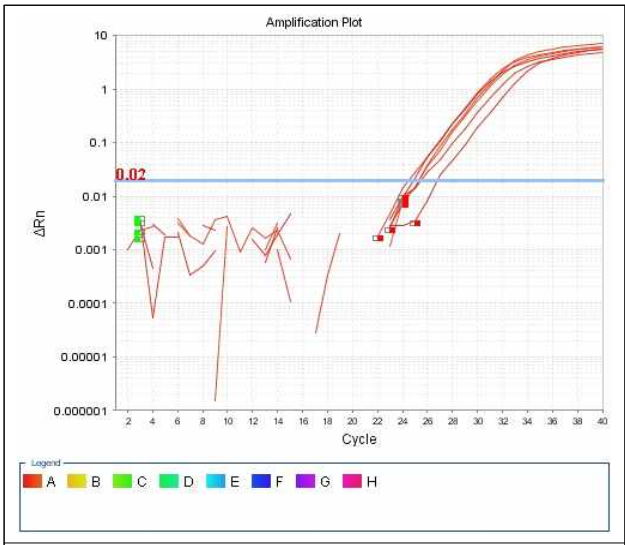
○ Aflatoxin B_1, Deoxynivalenol, Ochratoxin, Aflatoxin M_1, Zearalenone, T-2 toxin Immuno-PCR kit를 이용하여 접종한 곰팡이 독소를 각각 확인하였다.

- Aflatoxin B_1 Immuno-PCR Kit은 평균값 93.33ng으로 나타났다. 본 시료에 대해서 유효성평가가 문제없이 Aflatoxin B_1을 확인할 수 있었다. 가루인 밀가루의 경우에는 원액을 사용하였을 경우, 1차 실험에는 53ng 정도로 낮게 나왔다. 이는 가루의 matrix가 항체반응에 저해가 일부 있었음을 보여주었다. 하지만 이것을 1/100로 희석하였을 경우, 반응이 저해 받지 않고 비슷한 양이 검출됨을 확인하였다.
- Deoxynivalenol Immuno-PCR Kit은 평균값이 92.56ng으로 나타났으며, Ochratoxin A Immuno-PCR kit는 84.89ng 으로 나타났고, Aflatoxin M_1 Immuno-PCR kit는 90.2 ng, Zearalenone Immuno-PCR kit 는 평균 92.89 ng, T-2 toxin Immuno-PCR kit는 91.0 ng 이 검출되었다.
- Ochratoxin A Immuno-PCR kit의 경우에는 84.89ng으로 다른 검출키트보다도 낮게 나옴을 확인할 수 있었다. 하지만 식약처에서 제시한 「식품 등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인」의 60~120%의 범위 내에 포함되어 있어 키트로 사용하기에 문제는 없다고 할 수 있다.

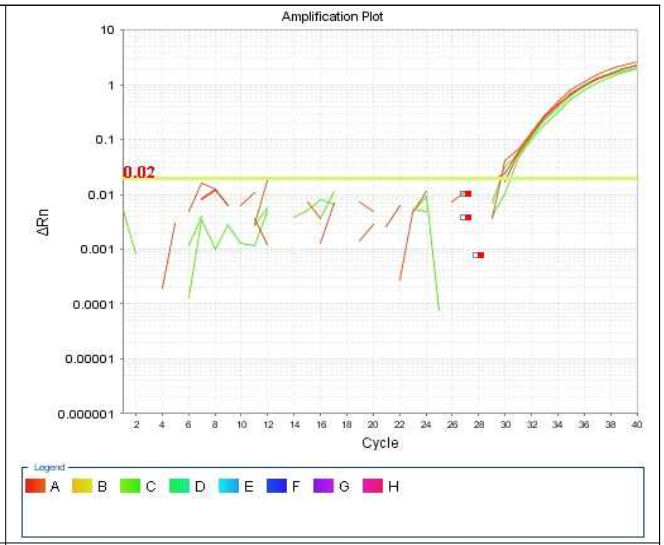
표 15. 인위적 접종식품 및 식품 매트릭스 별 유효성평가

시료 (100ng 접종)		검출(ng)					
		Aflatoxin B_1 Immuno-PCR kit	Deoxynivalenol Immuno-PCR kit	Ochratoxin Immuno-PCR kit	Aflatoxin M_1 Immuno-PCR kit	Zearalenone Immuno-PCR kit	T-2 toxin Immuno-PCR kit
곡류	옥수수	97	103	85	93	98	96
	귀리	105	92	81	86	89	94
견과류	호두	95	91	83	95	94	88
	땅콩	88	89	96	95	94	86
동물사료	단미사료	89	87	82	84	99	87
	배합사료	95	85	84	87	99	88
가공품	커피원두	95	105	98	97	95	96
	밀가루[주1)]	84	87	83	88	87	86
	된장	92	94	72	87	81	98
평균		93.33	92.56	84.89	90.22	92.89	91.00

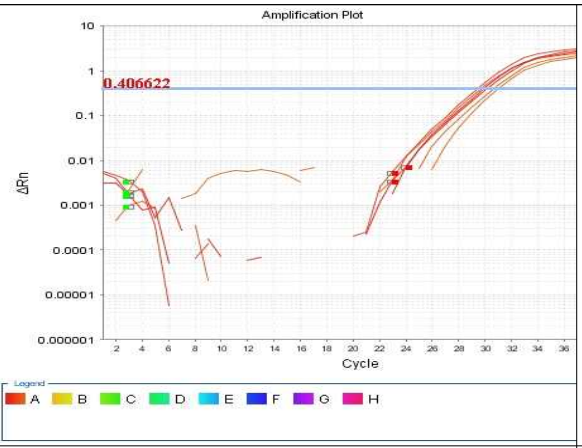
주1) 밀가루의 경우 1:100로 희석하여 수행



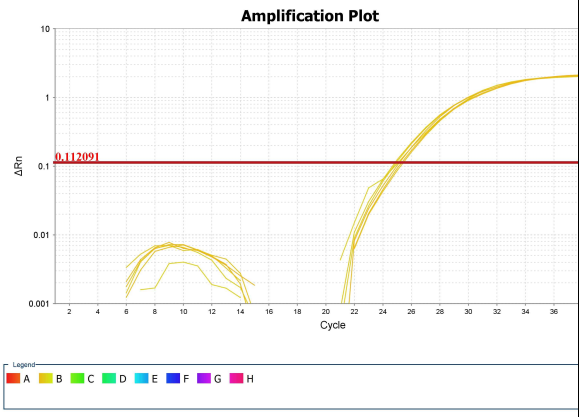
Aflatoxin B_1 Immuno-PCR kit



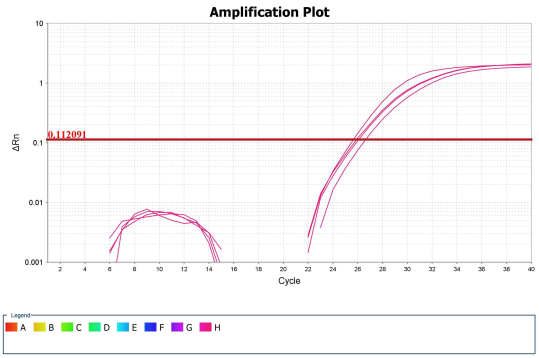
Deoxynivalenol Immuno-PCR kit



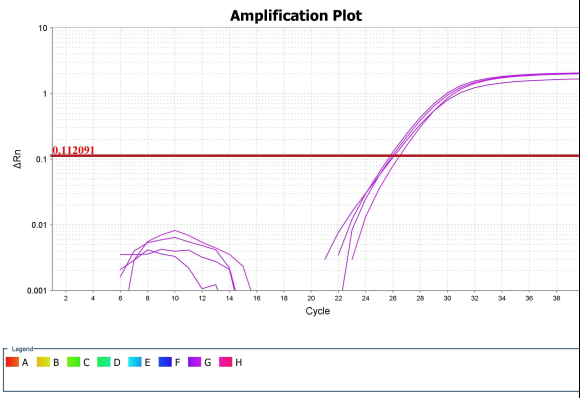
Ochratoxin A Immuno-PCR kit



Aflatoxin M_1 Immuno-PCR kit



Zearalenone Immuno-PCR kit



T-2 toxin Immuno-PCR kit

그림 66. Immuno-PCR kit의 인위적 접종식품 유효성평가 real time PCR 결과

(2) 식품 등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인과 비교 조사

ㅇ 2016년 4월 식품의약품안전처 제시한「식품 등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인」은 개발된 시험법에 대한 표준절차 및 가이드라인을 나타내고 있다. 본 가이드라인은『식품의약품안전처 지침 등의 관리에 관한 규정(식약처예규, 2016)』에 따른 것이다. 여기에는 시험법 검증 절차 및 시험법 검증의 세부 고려사항, 화학적 시험법의 검증요소를 제시하고 있다.

ㅇ 본 과제의 Immuno-PCR을 이용한 곰팡이 독소 정량분석키트는 곰팡이 독소를 확인하는 방법으로서 위의 가이드라인을 충족할 필요가 있다. 가이드라인의 내용에는 다음 표와 같이 나타나 있을 것을 볼 수 있다.

ㅇ 곰팡이독소 시험법의 검증은 EC Regulation을 준용하여 다음을 포함하여 실시하도록 되어 있다.

ㅇ 비교조사결과

- 가이드라인 자료에서 확인하였듯이 아플라톡신의 회수율은 농도 범위마다 다르나, 일반적으로 60~120%이내의 기준범위를 가지고 있다. 본 과제에서 개발한 키트의 경우 80~105% 정도의 회수율을 가지고 있으며, triplicate로 확인한 경우에도 오차가 크지 않음을 확인할 수 있다.

- 다만 밀가루의 경우에는 다른 농산물과의 특성이 달라 밀가루가 물에 풀어지는 것으로 matrix가 혼탁하여 50%로 나타났으며, 낮은 수율임을 확인할 수 있었다. Mycotoxin 단클론 항체와의 반응에 저해작용이 어느 정도 있는 것으로 생각되며, 이에 대한 matrix 별 시험방법을 연구하여 높은 회수율이 나올 수 있도록 차년도 과제에는 집중 연구할 필요가 있다.

- Ochratoxin Immuno-PCR kit의 경우에는 Aflatoxin B_1, Deoxynivalenol Immuno-PCR kit 보다도 20ng정도의 민감도 차이가 나는 것을 확인할 수 있었다. 식약처의 「식품 등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인」에 비쳐볼 때 시험법의 표준절차에 해당하는 민감도를 가지고 있으나 Aflatoxin B_1, Deoxynivalenol Immuno-PCR kit 보다는 낮으므로 이에 대한 연구가 추가적으로 필요할 것으로 판단된다.

표 16. 곰팡이독소 시험법의 검증요소 및 범위

검증요소	기준범위
검출한계(LOD)	Based on 3.3×σ/S of method blanks
정량한계(LOQ)	Based on 10×σ/S of method blanks
직선성(Linearity)	Linearity(R^2) ≥ 0.99
반복성(RSDr)	곰팡이독소별, 농도에 따라(아래표)
재현성(RSD_R)	곰팡이독소별, 농도에 따라(아래표)
회수율(Recovery)	곰팡이독소별, 농도에 따라(아래표)

1) 아플라톡신

검증요소	농도범위	기준범위
회수율(Recovery) 아플라톡신 B_1,B_2,G_1,G_2	< 1.0 ug/kg	50 ~ 120 %
	1 ~ 10 ug/kg	70 ~ 110 %
	> 1.0 ug/kg	80 ~ 110 %
회수율(Recovery) 아플라톡신 M_1	0.01 ~ 0.05 ug/kg	60 ~ 120 %
	> 0.05 ug/kg	70 ~ 110 %
재현성(RSD_R)%	모든 농도	Horwitz Equation 식에 따라 산출한 값 (최대 허용 범위는 산출값 2배)
반복성(RSDr) %	해당 농도	0.66 × 재현성(RSD_R)%

※ Horwitz Equation

$$RSD_R = 2^{(1-0.5\log C)}$$

C: 농도비(예로, 1=100 g/100 g, 0.001 = 1,000 mg/kg)

2) 오크라톡신 A

농도범위(ug/kg)	회수율(Recovery)	반복성(RSDr) %	재현성(RSD_R)%
< 1	50 ~ 120 %	≤ 40	≤ 60
1-10	70 ~ 110 %	≤ 20	≤ 30

3) 파툴린

농도범위(ug/kg)	회수율(Recovery)	반복성(RSDr) %	재현성(RSD_R)%
< 20	50 ~ 120 %	≤ 30	≤ 40
20 - 50	70 ~ 105 %	≤ 20	≤ 30
> 50	75 ~ 105 %	≤ 15	≤ 25

4) 데옥시니발레놀

농도범위(ug/kg)	회수율(Recovery)	반복성(RSDr) %	재현성(RSD_R)%
> 100 ~ ≤ 500	60 ~ 110 %	≤ 20	≤ 40
> 500	70 ~ 120 %	≤ 20	≤ 40

5) 제랄레논

농도범위(ug/kg)	회수율(Recovery)	반복성(RSDr) %	재현성(RSD_R)%
≤ 50	60 ~ 120 %	≤ 40	≤ 50
> 50	70 ~ 120 %	≤ 25	≤ 40

6) 푸모니신 B_1, B_2

농도범위(ug/kg)	회수율(Recovery)	반복성(RSDr) %	재현성(RSD_R)%
≤ 500	60 ~ 120 %	≤ 30	≤ 60
> 500	70 ~ 110 %	≤ 20	≤ 30

마. 실제 식품 적용 평가

○ 본 과제에서 개발한 키트로서의 적합성을 평가하기 위해, 시중에 유통되는 농산물(옥수수, 쌀, 귀리, 서리태, 현미, 메주, 고춧가루, 보리, 조조), 견과류(호두, 땅콩, 마카다미아, 아몬드, 캐슈넛, 피칸, 피스타치오), 동물사료(어분, 단미사료, 배합사료, 애견사료, 애완동물사료), 커피원두, 가공품(인스턴트커피, 카레가루, 영아용조제식, 면류, 비스킷, 고추장, 된장, 시리얼, 간장, 건조과일(무화과, 망고), 축산물(소고기, 돼지고기, 닭) 등 총 7분류 37종을 대상으로 총 120종을 대상으로 실제 식품 적용 평가를 수행하였다.

○ Aflatoxin B_1 Immuno-PCR kit

- 전체 120개 제품 중 21종이 검출되었으며, 검출범위는 불검출부터 10.5 ng이었다. 농산물에서는 귀리와 보리가 각각 2.5, 10.3 ng이 검출되었으며, 견과류에서는 호두 2건, 땅콩1건, 마카다미아 1건, 아몬드 2건, 캐슈넛 1건, 피칸 3건, 피스타치오 1건 등이 불검출에서 7.1 ng 검출되었다. 또한 동물사료에서는 어분 1건, 단미사료 3건, 애견사료1건, 배합사료 1건, 애완동물사료 1건등이 검출되었고, 커피원드는 검출되지 않았다. 가공품 및 축산물에서는 검출되지 않았다.

○ Ochratoxin A Immuno-PCR kit

- 전체 120개 제품 중 26종이 검출되었으며, 검출범위는 불검출부터 8.75 ng이었다. 농산물에서는 옥수수, 고춧가루에서 검출되었고, 견과류에서는 호두 3종, 땅콩 2건, 아몬드 2종, 캐슈넛 1종, 피스타치오 1건, 브라질너트 1건 등이 검출되었고, 동물사료에는 어분, 단미사료 배합사료 애견사료 등이 각각 1건씩 검출, 커피원두가 10건 중 6종이 검출되었다. 그 범위로는 불검출로부터 8.7 ng 검출되어 다른 종류와 달리 커피원두에서 높은 검출을 보였다. 가공품과 축산물에서는 검출되지 않았다.

○ Zearalenon Immuno-PCR kit

- 전체 120개 제품 중 17종이 검출되었으며, 농산물 2종, 견과류 중 호두 3건, 땅콩 2건, 아몬드 2건, 피스타치오 1건, 피칸 1건 등 총 9건이 검출되었고, 동물사료에는 단미사료, 배합사료 애견사료 등 5건이 검출되었다. 검출범위는 불검출로부터 최대 37.0 ng이 검출되었다.

○ Deoxynivalenol Immuno-PCR kit

- 전체 120개 제품 중 21종이 검출되었으며, 검출범위는 불검출로부터 145.1ng 이 검출되었다. 옥수수 1건, 고춧가루, 조조 1건으로 총 3건의 농산물에서 검출되었고, 호두에서 2건, 땅콩에서 2건, 마카다미아 1건, 아몬드 2건, 피칸 3건, 브라질너트 1건으로 11건의 견과류에서 데옥시니발레놀이 검출되었다. 동물사료에서는 모두 6건으로 어분, 단미사료 배합사료 등에서 검출되었고, 가공품에서는 된장(2.5ng)만이 검출되었다. 이 중 가장 높은 검출량을 보인 것은 애견사료로 145.1 ng이 검출되었다.

○ T-2 toxin Immuno-PCR kit

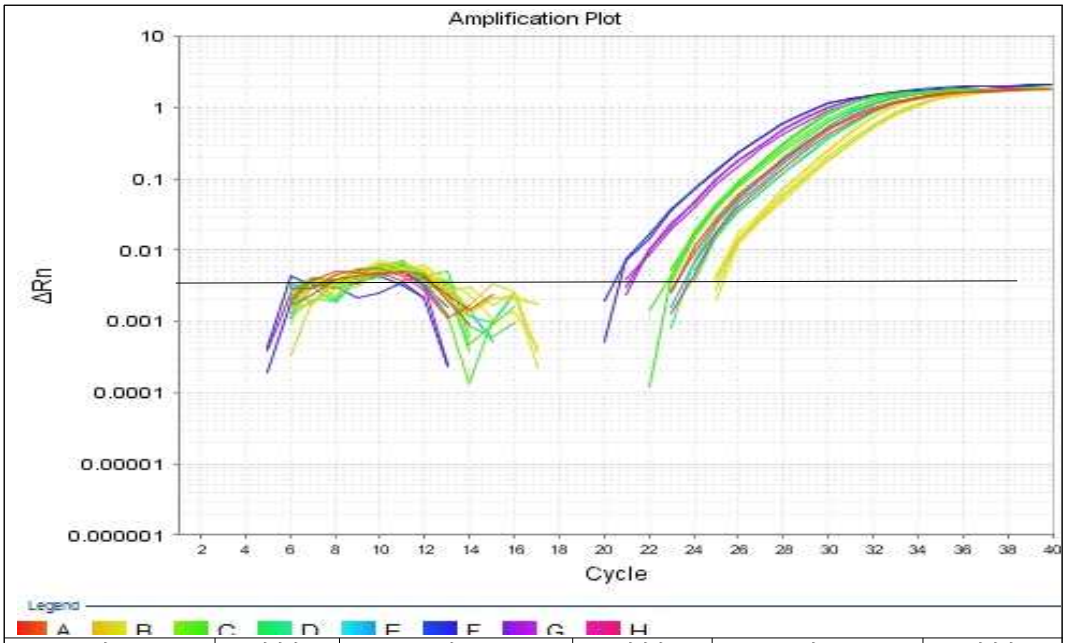
- T-2 toxin 의 경우 전체 120개 제품 중 20종이 검출되었다. 검출범위는 불검출부터 195.3ng 이었다. 농산물 중 서리태와 보리에서 검출되었으며, 견과류에서는 호두 2종이 각각 21 ng, 124.6 ng 이 검출되었고, 땅콩은 2건 아몬드에서 3종이 검출되었는데, 그 중 1건이 195.3ng으로 가장 많았다. 동물의 경우, 모두 6종이 검출되었고, 커피원에서 1건, 고추장에서 1건 이 검출되었고, 축산물에서는 검출되지 않았다.

○ Aflatoxin M_1 Immuno-PCR kit

- 전체 120개 제품 중 3종이 검출되었으며, 그 범위는 불검출로부터 0.42 ng 이었다. Aflatoxin M1의 특성상 *Aspergillus flavus, Aspergillus parasiticus* 및 *Aspergillus nomius* 종에 의해 생성되는 아플라톡신 중 B1의 체내 대사산물로 알려져 있다. 이는 아플라톡신 B_1이 오염된 곡류를 섭취한 소의 우유에서 검출될 확률이 높다. 본 실제 식품 적용 평가에서 있어서, 15개의 우유 시료 중 12종은 시중에서 판매 중인 우유를 대상으로 실험하였고, 3종은 주관기관에서 시험재료로 보관 중인 시료를 사용하여 확인하였다.

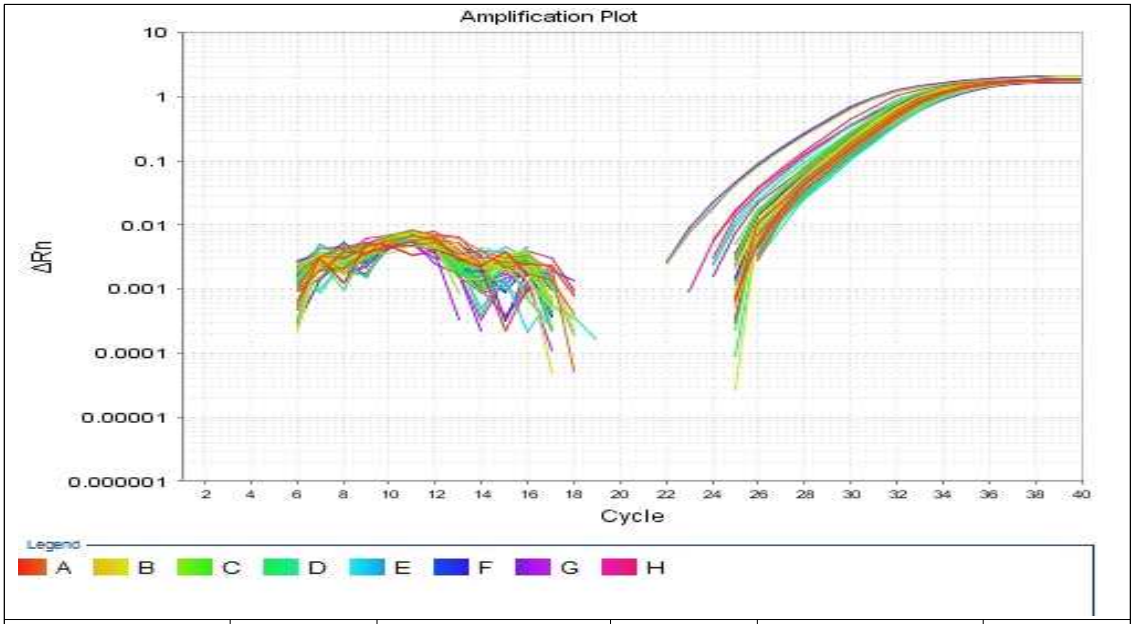
표 17. 시중 유통 식품검체를 이용한 field test

식품검체	검체수	검사방법에 따른 양성판정 검체수					
		Aflatoxin B_1	Ochratoxin	Zearalenone	Deoxynivalenol	T-2 toxin	Aflatoxin M_1
농산물	20	2	3	3	3	2	0
견과류	30	12	13	7	11	10	0
동물사료	30	7	4	5	6	6	0
커피원두	10	0	6	0	0	1	0
가공품	15	0	0	1	1	1	0
축산물	15	0	0	0	0	0	3
계	120	21	26	16	21	20	3



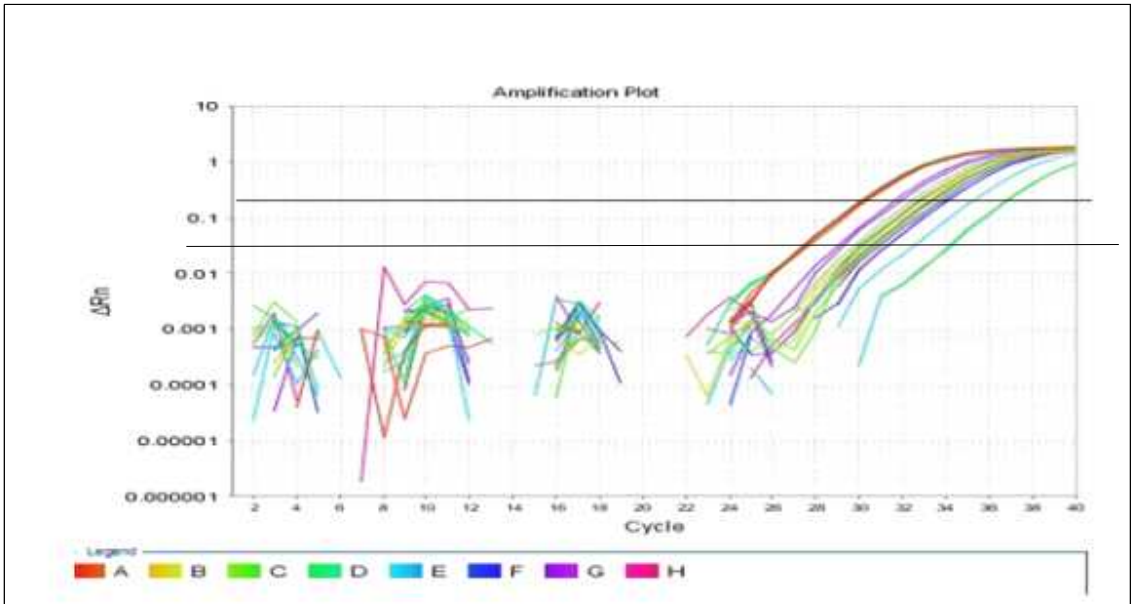
시료		정량값	시료		정량값	시료		정량값
농 산 물	옥수수1	-	견과류	피칸	1.5	커 피 원두	커피원두	-
	옥수수2	-		피칸	-		커피원두	-
	옥수수3	-		피칸	-		커피원두	-
	쌀1	-		피스타치오	-		커피원두	-
	쌀2	-		피스타치오	1.0		커피원두	-
	귀리1	2.5		피스타치오	-		커피원두	-
	귀리2	-		브라질너트	-		커피원두	-
	서리태1	-		브라질너트	2.9		커피원두	-
	서리태2	-		피칸	6.0		커피원두	-
	현미1	-		피칸	2.1		커피원두	-
	현미2	-	동물 사료	어분	-	가 공 품	인스턴트커피	-
	메주	-		어분	-		카레가루	-
	메주	-		어분	-		영아용조제식	-
	고추가루	-		어분	3.1		면류	-
	고추가루	-		어분	-		비스킷	-
	보리1	10.3		단미사료	0.4		비스킷	-
	보리2	-		단미사료	-		고추장	-
	보리3	-		단미사료	1.5		고추장	-
	조조1	-		단미사료	-		된장	-
	조조2	-		단미사료	10.5		된장	-
견 과 류	호두	-		단미사료	-		시리얼	-
	호두	-		단미사료	-		시리얼	-
	호두	2.2		배합사료	-		간장	-
	호두	6.3		배합사료	-		건조과일(무화과)	-
	호두	-		애견사료	9.8		건조과일(망고)	-
	땅콩	-		배합사료	-	축 산 물	소고기	-
	땅콩	-		배합사료	-		소고기	-
	땅콩	3.9		배합사료	7.8		소고기	-
	땅콩	-		배합사료	-		소고기	-
	땅콩	-		배합사료	-		소고기	-
	마카다미아	7.1		애견사료	-		돼지고기	-
	마카다미아	-		애견사료	-		돼지고기	-
	마카다미아	-		애견사료	-		돼지고기	-
	아몬드	1.8		애견사료	-		돼지고기	-
	아몬드	2.1		애견사료	-		돼지고기	-
	아몬드	-		애완동물사료	-		닭	-
	아몬드	-		애완동물사료	-		닭	-
	아몬드	-		애완동물사료	-		닭	-
	캐슈넛	1.1		애완동물사료	9.0		닭	-
	캐슈넛	-		애완동물사료	-		닭	-

그림 65. Aflatoxin B_1 Immuno-PCR kit



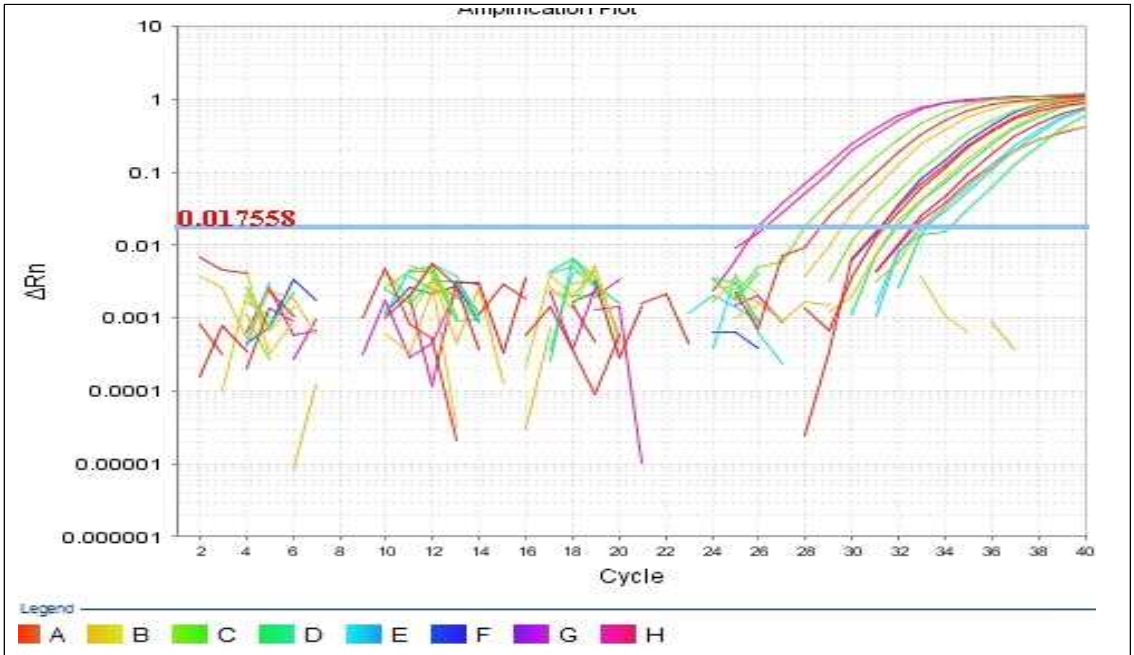
시료		정량값	시료		정량값	시료		정량값
농산물	옥수수1	-	견과류	피칸	0.5	커피원두	커피원두	2.1
	옥수수2	3.5		피칸	-		커피원두	
	옥수수3	1.9		피칸	-		커피원두	8.7
	쌀1	-		피스타치오	-		커피원두	
	쌀2	-		피스타치오	-		커피원두	0.01
	귀리1	-		피스타치오	0.2		커피원두	
	귀리2	-		브라질너트	-		커피원두	0.3
	서리태1	-		브라질너트	0.3		커피원두	
	서리태2	-		피칸	1.6		커피원두	2.8
	현미1	-		피칸	-		커피원두	0.24
	현미2	-	동물사료	어분	-	가공품	인스턴트커피	-
	메주	-		어분	-		카레가루	-
	메주	-		어분	2.1		영아용조제식	-
	고추가루	2.1		어분	-		면류	-
	고추가루	-		어분	-		비스킷	-
	보리1	-		단미사료	5.4		비스킷	-
	보리2	-		단미사료	-		고추장	-
	보리3	-		단미사료	-		고추장	-
	조조1	-		단미사료	-		된장	-
	조조2	-		단미사료	-		된장	-
견과류	호두	-		단미사료	-		시리얼	-
	호두	0.4		단미사료	-		시리얼	-
	호두	-		배합사료	-		간장	-
	호두	4.9		배합사료	-		건조과일(무화과)	-
	호두	2.1		애견사료	-		건조과일(망고)	-
	땅콩	-		배합사료	6.8	축산물	소고기	-
	땅콩	-		배합사료	-		소고기	-
	땅콩	1.5		배합사료	-		소고기	-
	땅콩	4.4		배합사료	-		소고기	-
	땅콩	-		배합사료	-		소고기	-
	마카다미아	-		애견사료	-		돼지고기	-
	마카다미아	-		애견사료	8.7		돼지고기	-
	마카다미아	-		애견사료	-		돼지고기	-
	아몬드	0.4		애견사료	-		돼지고기	-
	아몬드	7.9		애견사료	-		돼지고기	-
	아몬드	2.5		애완동물사료	-		닭	-
	아몬드	-		애완동물사료	-		닭	-
	아몬드	-		애완동물사료	-		닭	-
	캐슈넛	2.1		애완동물사료	-		닭	-
	캐슈넛	-		애완동물사료	-		닭	-

그림 66. Ochratoxin Immuno-PCR kit



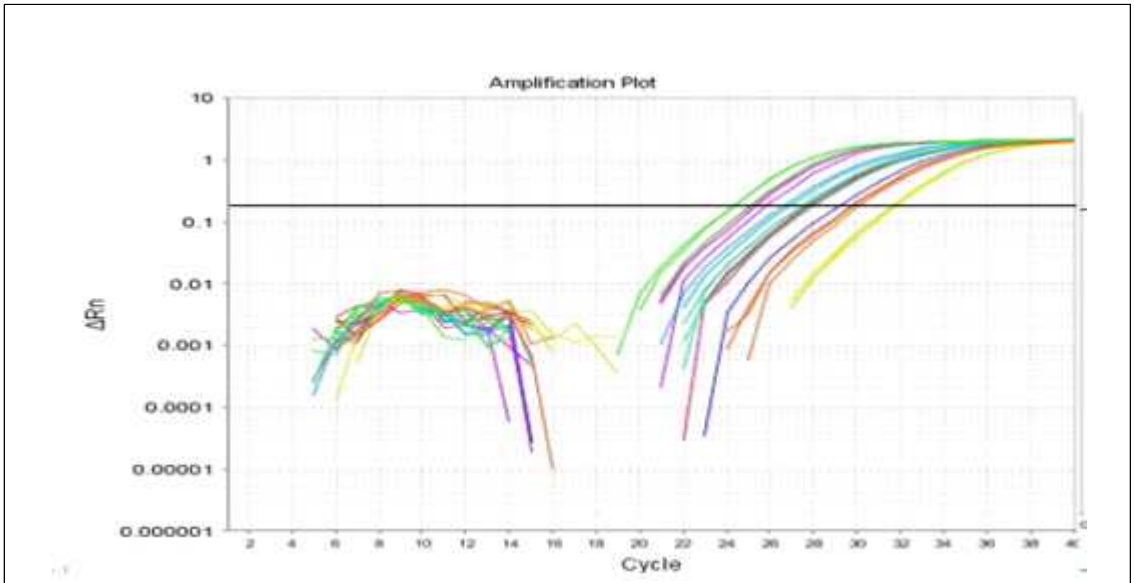
시료		정량값	시료		정량값	시료		정량값
농산물	옥수수1	-	견과류	피칸	-	커피원두	커피원두	-
	옥수수2	3.5		피칸	-		커피원두	-
	옥수수3	-		피칸	-		커피원두	-
	쌀1	-		피스타치오	-		커피원두	-
	쌀2	-		피스타치오	4.1		커피원두	-
	귀리1	-		피스타치오	-		커피원두	-
	귀리2	-		브라질너트	-		커피원두	-
	서리태1	-		브라질너트	-		커피원두	-
	서리태2	-		피칸	-		커피원두	-
	현미1	-		피칸	0.1		커피원두	-
	현미2	-	동물사료	어분	-	가공품	인스턴트커피	-
	메주	-		어분	-		카레가루	5.4
	메주	2.7		어분	-		영아용조제식	-
	고추가루	-		어분	-		면류	-
	고추가루	-		어분	-		비스킷	-
	보리1	-		단미사료	-		비스킷	-
	보리2	-		단미사료	-		고추장	-
	보리3	-		단미사료	2.5		고추장	-
	조조1	-		단미사료	-		된장	-
	조조2	-		단미사료	-		된장	-
견과류	호두	11.6		단미사료	-		시리얼	-
	호두	-		단미사료	-		시리얼	-
	호두	37..0		배합사료	6.5		간장	-
	호두	-		배합사료	-		건조과일(무화과)	-
	호두	24.5		애견사료	-		건조과일(망고)	-
	땅콩	-		배합사료	-	축산물	소고기	-
	땅콩	-		배합사료	-		소고기	-
	땅콩	16.7		배합사료	-		소고기	-
	땅콩	21.6		배합사료	2.8		소고기	-
	땅콩	-		배합사료	-		소고기	-
	마카다미아	-		애견사료	-		돼지고기	-
	마카다미아	-		애견사료	-		돼지고기	-
	마카다미아	-		애견사료	-		돼지고기	-
	아몬드	-		애견사료	9.0		돼지고기	-
	아몬드	1.0		애견사료	-		돼지고기	-
	아몬드	-		애완동물사료	-		닭	-
	아몬드	54.2		애완동물사료	-		닭	-
	아몬드	-		애완동물사료	12.5		닭	-
	캐슈넛	-		애완동물사료	-		닭	-
	캐슈넛	-		애완동물사료	-		닭	-

그림 67. Zearalenone Immuno-PCR kit



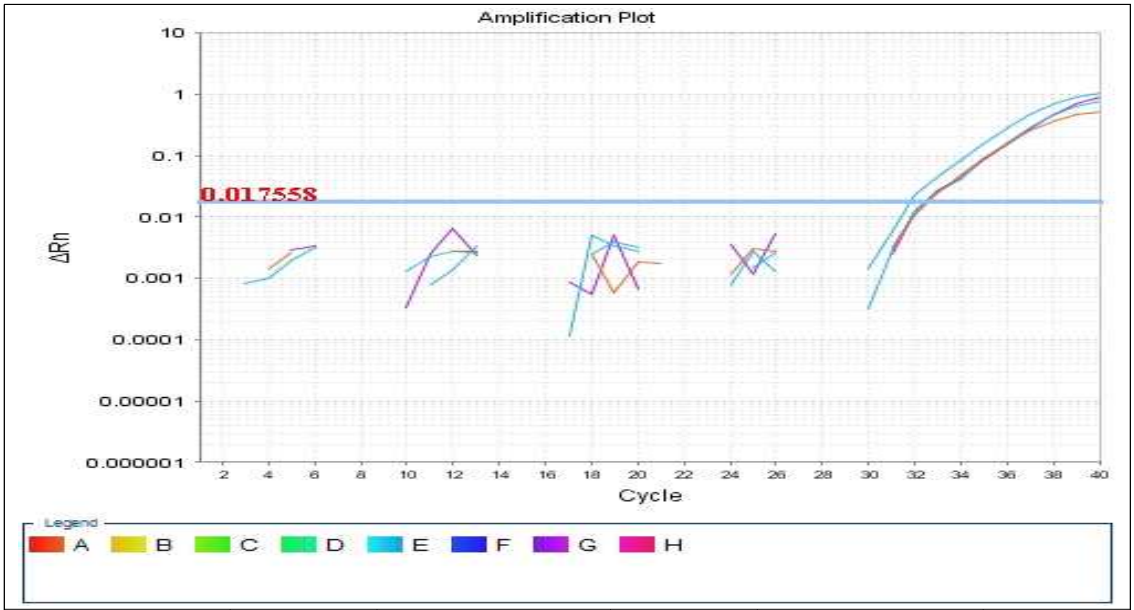
시료		정량값	시료		정량값	시료		정량값
농산물	옥수수1	-	견과류	피칸	68.9	커피원두	커피원두	-
	옥수수2	2.1		피칸	57.5		커피원두	-
	옥수수3	-		피칸	-		커피원두	-
	쌀1	-		피스타치오	-		커피원두	-
	쌀2	-		피스타치오	-		커피원두	-
	귀리1	-		피스타치오	-		커피원두	-
	귀리2	-		브라질너트	2		커피원두	-
	서리태1	-		브라질너트	-		커피원두	-
	서리태2	-		피칸	2		커피원두	-
	현미1	-		피칸	-		커피원두	-
	현미2	-	동물사료	어분	-	가공품	인스턴트커피	-
	메주	-		어분	-		카레가루	-
	메주	-		어분	-		영아용조제식	-
	고추가루	25.4		어분	2.3		면류	-
	고추가루	-		어분	-		비스킷	-
	보리1	-		단미사료	-		비스킷	-
	보리2	-		단미사료	-		고추장	-
	보리3	-		단미사료	-		고추장	-
	조조1	29.6		단미사료	5.8		된장	2.5
	조조2	-		단미사료	-		된장	-
견과류	호두	-		단미사료	-		시리얼	-
	호두	-		단미사료	-		시리얼	-
	호두	20.6		배합사료	-		간장	-
	호두	140.6		배합사료	-		건조과일(무화과)	-
	호두	-		애견사료	-		건조과일(망고)	-
	땅콩	-		배합사료	45.9	축산물	소고기	-
	땅콩	105.6		배합사료	-		소고기	-
	땅콩	-		배합사료	-		소고기	-
	땅콩	15.8		배합사료	-		소고기	-
	땅콩	-		배합사료	-		소고기	-
	마카다미아	-		애견사료	145.1		돼지고기	-
	마카다미아	48.5		애견사료	-		돼지고기	-
	마카다미아	-		애견사료	-		돼지고기	-
	아몬드	25.6		애견사료	-		돼지고기	-
	아몬드	-		애견사료	-		돼지고기	-
	아몬드	114.1		애완동물사료	-		닭	-
	아몬드	-		애완동물사료	12.6		닭	-
	아몬드	-		애완동물사료	-		닭	-
	캐슈넛	-		애완동물사료	24.9		닭	-
	캐슈넛	-		애완동물사료	-		닭	-

그림 68. Deoxynivalenol Immuno-PCR kit



시료		정량값	시료		정량값	시료		정량값
농산물	옥수수1	-	견과류	피칸	170.5	커피원두	커피원두	-
	옥수수2	-		피칸	-		커피원두	-
	옥수수3	-		피칸	-		커피원두	0.1
	쌀1	-		피스타치오	149.6		커피원두	-
	쌀2	-		피스타치오	-		커피원두	-
	귀리1	-		피스타치오	24.5		커피원두	-
	귀리2	-		브라질너트	-		커피원두	-
	서리태1	26.9		브라질너트	-		커피원두	-
	서리태2	-		피칸	-		커피원두	-
	현미1	-		피칸	-		커피원두	-
	현미2	-	동물사료	어분	-	가공품	인스턴트커피	-
	메주	-		어분	-		카레가루	-
	메주	-		어분	5.4		영아용조제식	-
	고추가루	-		어분	-		면류	-
	고추가루	-		어분	-		비스킷	-
	보리1	3.1		단미사료	-		비스킷	-
	보리2	-		단미사료	21.5		고추장	-
	보리3	-		단미사료	-		고추장	0.26
	조조1	-		단미사료	-		된장	-
	조조2	-		단미사료	-		된장	-
견과류	호두	-		단미사료	-		시리얼	-
	호두	21.0		단미사료	-		시리얼	-
	호두	124.6		배합사료	23.6		간장	-
	호두	-		배합사료	-		건조과일(무화과)	-
	호두	-		애견사료	-		건조과일(망고)	-
	땅콩	121.3		배합사료	33.6	축산물	소고기	-
	땅콩	-		배합사료	-		소고기	-
	땅콩	114.0		배합사료	-		소고기	-
	땅콩	-		배합사료	-		소고기	-
	땅콩	-		배합사료	-		소고기	-
	마카다미아	-		애견사료	28.1		돼지고기	-
	마카다미아	-		애견사료	-		돼지고기	-
	마카다미아	-		애견사료	-		돼지고기	-
	아몬드	10.2		애견사료	-		돼지고기	-
	아몬드	-		애견사료	-		돼지고기	-
	아몬드	195.3		애완동물사료	-		닭	-
	아몬드	-		애완동물사료	-		닭	-
	아몬드	21.6		애완동물사료	65.0		닭	-
	캐슈넛	-		애완동물사료	-		닭	-
	캐슈넛	-		애완동물사료	-		닭	-

그림 69. T-2 toxin Immuno-PCR kit



시료		정량값	시료		정량값	시료		정량값
농산물	옥수수1	-	견과류	피칸	-	커피원두	커피원두	-
	옥수수2	-		피칸	-		커피원두	-
	옥수수3	-		피칸	-		커피원두	-
	쌀1	-		피스타치오	-		커피원두	-
	쌀2	-		피스타치오	-		커피원두	-
	귀리1	-		피스타치오	-		커피원두	-
	귀리2	-		브라질너트	-		커피원두	-
	서리태1	-		브라질너트	-		커피원두	-
	서리태2	-		피칸	-		커피원두	-
	현미1	-		피칸	-		커피원두	-
	현미2	-	동물사료	어분	-	가공품	인스턴트커피	-
	메주	-		어분	-		카레가루	-
	메주	-		어분	-		영아용조제식	-
	고추가루	-		어분	-		면류	-
	고추가루	-		어분	-		비스킷	-
	보리1	-		단미사료	-		비스킷	-
	보리2	-		단미사료	-		고추장	-
	보리3	-		단미사료	-		고추장	-
	조조1	-		단미사료	-		된장	-
	조조2	-		단미사료	-		된장	-
견과류	호두	-		단미사료	-		시리얼	-
	호두	-		단미사료	-		시리얼	-
	호두	-		배합사료	-		간장	-
	호두	-		배합사료	-		건조과일(무화과)	-
	호두	-		애견사료	-		건조과일(망고)	-
	땅콩	-		배합사료	-	축산물	소고기	-
	땅콩	-		배합사료	-		소고기	-
	땅콩			배합사료			소고기	
	땅콩	-		배합사료	-		돼지고기	-
	땅콩	-		배합사료	-		돼지고기	-
	마카다미아	-		애견사료	-		돼지고기	-
	마카다미아	-		애견사료	-		닭	-
	마카다미아	-		애견사료	-		닭	-
	아몬드	-		애견사료	-		닭	-
	아몬드	-		애견사료	-		우유	-
	아몬드	-		애완동물사료	-		우유	-
	아몬드	-		애완동물사료	-		우유	-
	아몬드	-		애완동물사료	-		우유(메덱스)	0.24
	캐슈넛	-		애완동물사료	-		우유(메덱스)	2.10
	캐슈넛	-		애완동물사료	-		우유(메덱스)	0.36

그림 70. Aflatoxin M_1 Immuno-PCR kit

바. Immuno-PCR 진단키트와 기기분석방법과의 비교 분석

○ 곰팡이독소를 확인하기 위해서는 기존방법(LC 등 기기분석과 ELISA 방법)과 본 과제 개발 방법인 Immuno-PCR이 사용될 수 있다. 기기분석은 LC 방법이 주로 사용되고 아플라톡신, 오크라톡신, 제랄레논 등을 확인할 수 있다. 10 ~ 1,000 pg 등의 범위 측정이 가능하며, 분석시간은 2~3일이 걸린다. 또한 진단키트로는 ELISA 방법이 대표적이며, 기기분석보다는 민감도가 떨어지지만 분석시간은 2시간 정도로 매우 빠르다. 본 과제 개발 진단키트는 기기분석과 같은 검출한계와 ELISA 방법과 비슷한 짧은 분석소요시간이 걸린다. 즉 높은 검출 범위와 짧은 분석시간이 본 과제 진단키트의 장점이라 할 수 있다.

표 18. Immuno-PCR 진단키트와 기기분석방법과의 비교

구 분	기기분석(LC)	기존 키트	개발 키트
검출 방법	Liquid Chromatography	ELISA, Lateral flow assay	Immuno-PCR(ELISA+ real time PCR)
종류	AFL B_1, M_1, OCT, ZEA, T-2, DON	AFL B_1, OCT, ZEA, T-2, DON	AFL B_1, M_1, OCT, ZEA, T-2, DON
검출 한계	10 ~1,000 pg	10ng ~ 10 ug	1~10 pg
분석소요시간	2~3 일	2시간	2시간 30분

○ 본 과제에서 개발한 키트와 LC 등의 기기분석방법을 견과류 30종에 적용한 시험결과, 진단키트 Aflatoxin B_1, Ochratoxin, Zearalenone, Deoxynivalenol, T-2 toxin, Aflatoxin M_1 이 각각 12, 13, 7, 11, 10, 0 종이 검출되었고 그 범위는 불검출부터 54.2ng/g이었다. 또한 기기분석 결과는 12, 13, 6, 10, 10, 0 종이 검출되었고, 그 범위는 불검출부터 65.4ng/g 으로 검출되었다. 이는 식품의약품안전처 지침 등의 관리에 관한 규정(식약처예규, 2016)에서 제시한 회수율이 80~105% 정도로 관련 규정을 준수하는 것으로 나타나 제품 출하시 문제가 없을 것으로 판단된다.

2. 식품에서 오염된 mycotoxigenic fungi를 검출하기 위한 real-time PCR 확인 및 개발

가. Mycotoxigenic fungi 검출위한 Real time PCR 개발

○ DNA 증폭 과정의 감지를 가능한 Real time PCR은 실시간 중합효소 연쇄반응 과정에서, DNA의 합성은 PCR 과정 동안 생성되는 형광의 강도에 의해 측정되며 이것은 모니터에서 확인할 수 있다 (Dorak, 2006). 형광 신호의 생성을 기반으로 한 세 가지의 가장 일반적인 qRT-PCR 방법이 있다.

- 첫번째는, 이중 가닥DNA에 혼입될 때 형광이 급격히 증가하는 FAM, HEX, VIC 등 같은 형광 물질이 반응에 첨가되고, DNA가 합성되는 동안 형광물질의 혼입이 감지된다.
- 두번째 방법은 형광 프라이머 확장을 기반으로 빛을 활용한 방법(LUX RT-PCR)으로, 형광 프라이머는 5' 말단에 4 내지 6개의 뉴클레오티드의 짧은 서열 꼬리를 가지며, 이것은 3' 말단과 상보적이다. 헤어핀 2차 구조의 결과는 형광의 적절한 억제를 제공하며, 프라이머가 PCR 과정 동안 이중 가닥 DNA에 결합될 때, 형광이 발산되고 10배까지 신호가 증가하게 된다.
- 세번째 방법은, 5' 말단에 형광 리포터 염료 및 다른 끝에 소광제에 의해 표지된 가수분해 탐지자(20 내지 30 염기)가 반응 혼합액에 첨가되는 것이다. 탐지자가 온전히 남아 있는 동안, 소광제와 형광 리포터 염료의 근접은 리포터에 의해 발산된 형광을 현저하게 감소시킨다. DNA 합성 동안, Taq DNA Polymerase의 5'에서 3'으로의 엑소뉴클레아제 활성은 소광제로부터 리포터 염료를 분리하고, 리포터 염료 신호는 비례적으로 증가하게 된다 (Dorak, 2006; Van der Velden et al ., 2003).

(1) 사용 표준 균주

○ 국립농업과학원 농업유전자원센터 (http://www.genebank.go.kr/)로부터 분양받은 균주를 Potato dextrose agar, Rose bengal Agar로 25℃에 7일 배양한 다음 genomic DNA를 추출한 다음 PCR 실험을 실시하였다(표 참조).

표 19. 곰팡이 독소 생성 균주 및 생성 특징

균 주	Reference (KACC*)	Mycotoxins 생성 및 특징
Aspergillus flavus	46449	Aflatoxin production; type II (norB/cypA), IC-L-B+ (omtA), AF type (aflR); meju standard strain of A. flavus
Aspergillus flavus	44986	Aflatoxin
Aspergillus ochraceus Wilhelm	45186	Ochratoxin
Aspergillus carbonarius Thom	45070	Ochratoxin
Aspergillus parasiticus Speare	46037	Aflatoxin B and G
Aspergillus parasiticus Speare	46901	Aflatoxin B and G
Penicillium expansum Link	40816	Patulin 88㎛/㎖, Citrinin 1.1㎍/㎖
Fusarium verticillioides (Sacc.) Nirenberg	45825	Fumonisin
Fusarium graminearum Schwabe	41042	Nivalenol
Fusarium graminearum Schwabe	41044	Zealanenone
Fusarium culmorum	43800	Zealanenone
Fusarium moniliforme	40386	Fumonisin
Fusarium tricinctum (Corda) Saccardo	42097	-
Fusarium proliferatum	40387	-
Fusarium sporotrichioides Sherb.	43804	
Fusarium proliferatum	40387	-
Penicillium roqueforti	45925	-
Penicillium verrucosum	-	Ochratoxin
Aspergillus ochraceus	-	Ochratoxin
Aspergillus carbonarius	-	Ochratoxin

* Korean Agricultural Culture Collection(KACC) : 국립농업과학원 농업유자자원센터 분양균주

(2) 곰팡이 Genomic DNA 추출

○ Fungal DNA를 분리하기 위하여 Liu 등의 실험방법을 변형시켜 사용하였다. 1.5ml eppendorf tube에 500㎕ lysis buffer (400mM tris-HCl [pH 8.0]+60 mM EDTA [pH 8.0], 150 mM NaCl+1% Sodium dodecyl sulfate)에 소량의 mecelia를 넣은 후 상온에서 10분간 방치 하고 pH 4.8로 교정하여 150㎕ potassium acetate를 넣었다. 그러고 나서 10,000 xg로 1분간 원심분리하여 상층액을 다른 eppendorf tube에 넣은 후 다시 원심분리하였다. 그리고 원심분리된 상층액을 eppendorf tube에 넣고 동량의 isopropyl alcohol를 넣은 후 뒤집어서 흔든 후 10,000 xg으로 2분간 원심 분리하여 상층액을 버렸다. DNA pellet을 300㎕의 70% ethanol로 세척한 후 10,000 RPM으로 5분간 원심분리하여 상층액을 버리고 DNA pellet을 진공펌프로 건조시켰다. 그리고 50㎕의 증류수에 용해시켰다.

○ 또한 전자동 장비인 eMEG (비오메리으사, 프랑스) 장비를 이용하여 DNA를 추출하는 방법도 확인하였다. 본 방법은 BOOM Technology라는 기술로 magnetic sillica를 이용하는 전자동 방법이다. 특징은 핵산을 안정화 시켜 잘 깨지지 않으며 한가지의 버퍼로 다양한 DNA를 추출할 수 있다. 이는 환경뿐만 아니라 곰팡이 식물체 동물 식품 등에서의 순도가 높은 DNA를 추출할 수 있다는 것이 특징이며, 원심분리도 필요없이 다량의 샘플에서 고순도의 DNA를 추출이 가능한 장비이다.

그림 71. 비오메리으사 eMAG 장비

(3) Primer 및 Probe 제작

- ○ Aflatoxin의 생성대사에 관여하는 nor gene을 대상으로 primer를 제작하였으며, nor gene은 *Aspergillus flavus* 등 *Aspergillus* strains에서 생산하는 aflatoxin를 확인하기 위한 유전자이며, Tri6 and FUM13-positive *Fusarium* strains을 중심으로 Tri6 gene은 trichothecene mycotoxin (Deoxynivalenone, Nivalenone), FUM13 gene은 fumonisin을 검출하기 위한 유전자를 사용하였고, otanps 유전자는 *ochratoxin* A를 확인하기 위한 유전자로 사용하였다.
- ○ Genebank M_003455와 Genebank M_003474, Genebank KU572432의 염기서열을 Appliedbiosystems의 Primer express 3.0을 사용하여 nor1 primer와 tri6, otanps primer를 제작하였다. 또한 fum 13 primer는 Waalwijk, C. et al, 2008 논문을 인용하였다.

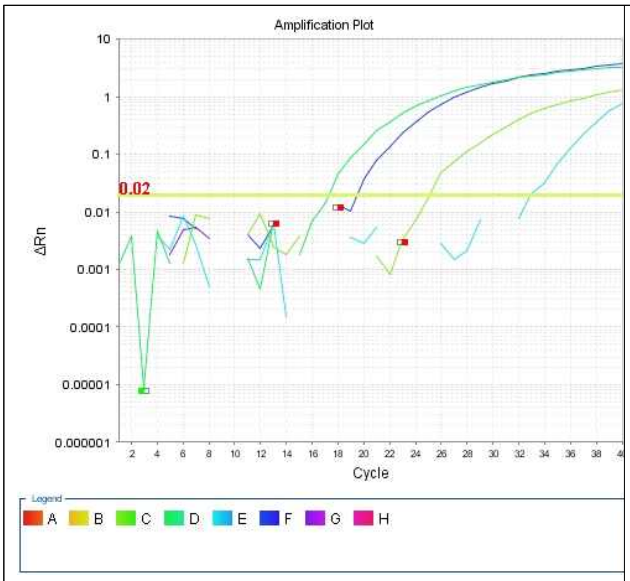
표 20. Mycotoxin 별 염기서열

Mycotoxin	Target gene	염기서열	References
Aflatoxin B_1	nor1	F : TCCAACTTCTTGCAGCAGAC R : CCTACGATCAAATGCCAATG Probe: FAM-CCGAGTTGGAATGTGCCTTCACC-TAMRA	본 연구
Trichothecene	Tri6	F : AACAGTGCATGCGTTGAAAT R : CCGTCATGTCGATCTGATTC Probe: FAM-CGCGCATCCTTCTGGACGAA-TAMRA	본 연구
Ochratoxin A	otanps	F:GCATGTCATCCTCGAACAGT R:GTGCGGTGCTGATAAGAGAA Probe: HEX-ACACGCCGCCACCATTTGAA-BHQ	본 연구
Fumonisin	FUM13	F:ATGCAAGAGGCGAGGCAA R:CCTCAGGGCATTGTTTAGAGGTT Probe: JOE-CAATGCCATCTTCTTG-BHQ	본 연구

(4) Real time PCR 시험결과

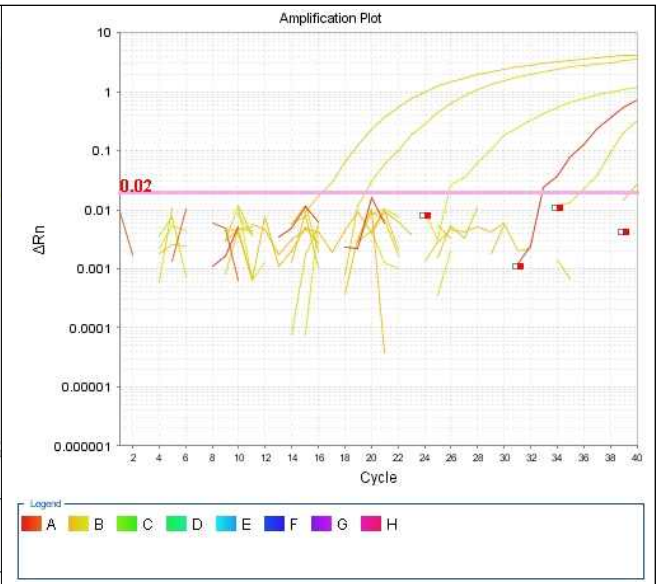
- ○ Aflatoxin B_1 생성균주에 대한 real time PCR 결과 (그림 A)
- - 모두 5개 균주인 *Aspergillus flavus* KACC 46449, *Aspergillus flavus* KACC 44986, *Aspergillus parasiticus* KACC 46037, *Aspergillus parasiticus* KACC 46901, Wild type A. *flavus*에서 반응이 일어남을 알 수 있다.
- ○ **Ochratoxin** 생성균주에 대한 real time PCR 결과 (그림 B)
- - *Aspergillus ochraceus Wilhelm* KACC 45186, *Aspergillus carbonarius Thom* KACC 45070, *Penicillium verrucosum, Aspergillus ochraceus, A. carbonarius, Wild type A. ochraceus* 등 6개 균주에서 real time PCR 반응이 일어남을 확인하였다.
- ○ **Deoxynivalenol** 생성균주에 대한 real time PCR 결과 (그림 C)
- - *Fusarium graminearum Schwabe* KACC 41042, *Fusarium graminearum Schwabe* KACC 41044, *Fusarium culmorum* KACC 43800 등 3균주에서 반응이 나타났다.
- ○ **Fumonisin** 생성균주에 대한 real time PCR 결과 (그림 D)

- *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg KACC 45825, *Fusarium moniliforme* KACC 40386 등 두 종류의 균주에서 Deoxynivalenol 생성이 일어남을 확인하였다.



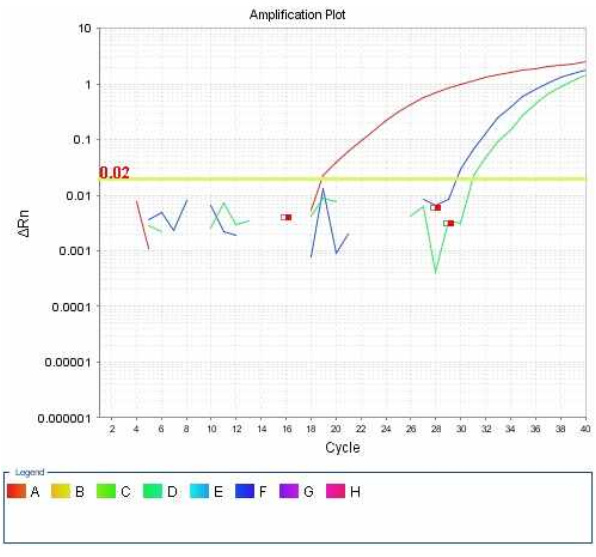
A. Aflatoxin B_1 생성균주

Aspergillus flavus KACC 46449
Aspergillus flavus KACC 44986
Aspergillus parasiticus KACC 46037
Aspergillus parasiticus KACC 46901
Wild type A. *flavus*



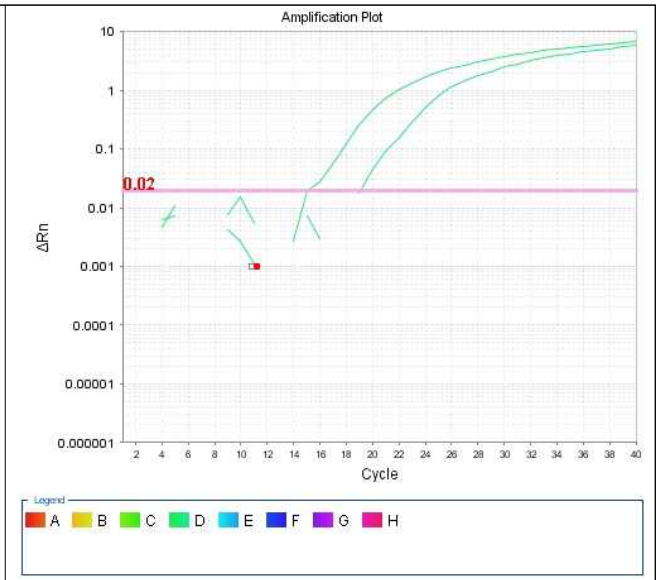
B. Ochratoxin 생성균주 확인

Aspergillus ochraceus Wilhelm KACC 45186
Aspergillus carbonarius Thom KACC 45070
Penicillium verrucosum
Aspergillus ochraceus
A. carbonarius
Wild type A. ochraceus



C. Deoxynivalenol 생성균주 확인

Fusarium graminearum Schwabe KACC 41042
Fusarium graminearum Schwabe KACC 41044
Fusarium culmorum KACC 43800



D. Fumonisin 생성균주 확인

Fusarium verticillioides (Sacc.) Nirenberg KACC 45825
Fusarium moniliforme KACC 40386

나. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 방법 개발

(1) 등온염기 증폭(Isothermal amplification)

○ 등온증폭기술의 원리

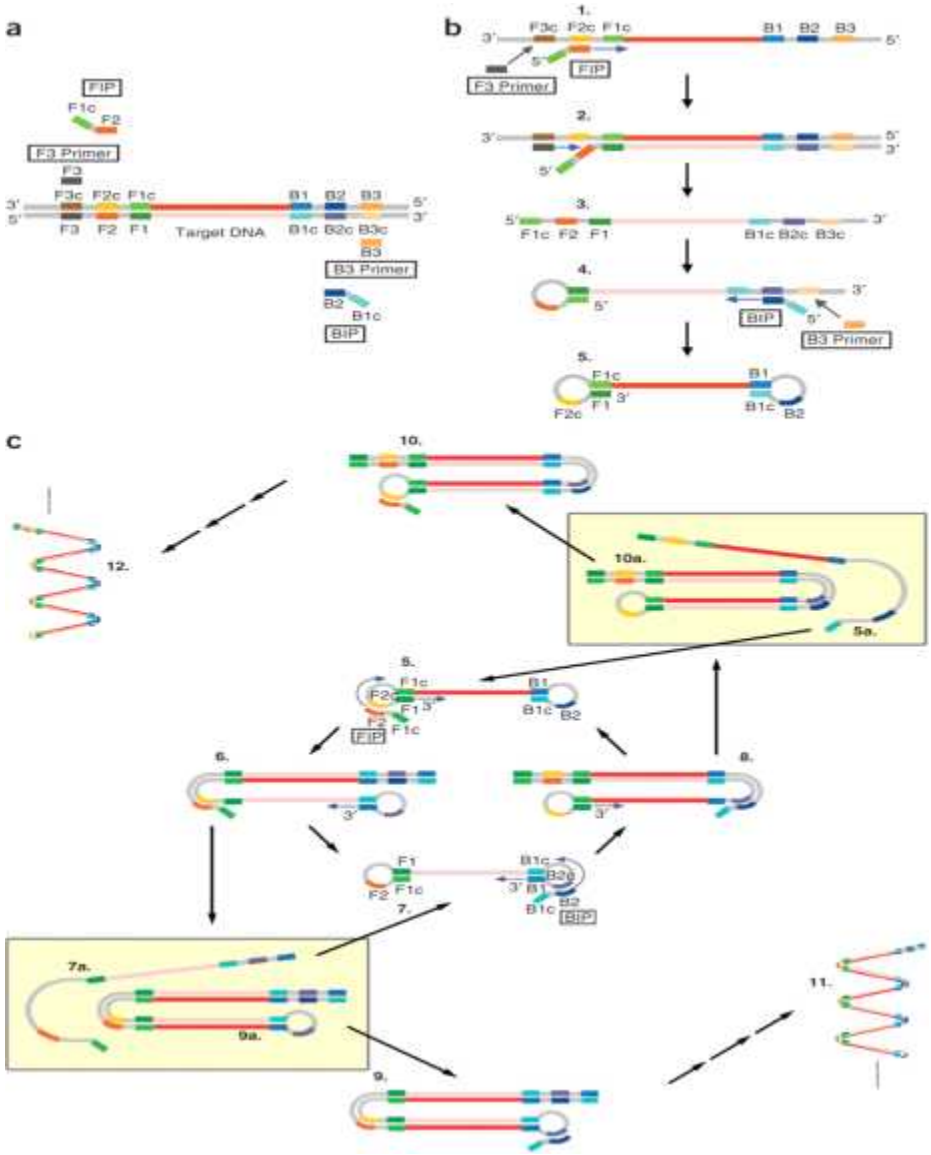


그림 72. 등온증폭의 원리

- Loop primer를 통해서 최초 샘플의 주형 DNA로부터 아령모양의 DNA를 만든 다음, Loop primer F로부터 stem-loop 구조의 DNA를 형성한다. 즉, 증폭 시 생산되는 염기는 양방향으로 증폭을 반복하여 loop 구조가 되며, 이는 multiple loops 구조와 같다고 볼 수 있다. 일반 PCR에서 사용하는 Taq-polymerase와는 다르게 Bst DNA polymerase는 strand displacement activity를 가지고 있어 일정한 온도에서 지속적으로 증폭이 일어날 수 있다.

- DNA polymerase는 효율적이고 지속적으로 Target DNA를 20~75분 안에 많은 양으로 증폭시킨다. 유전자 Target DNA의 여러 다른 부위에 붙어 시작되고 자동적으로

반복되는 염기 증폭으로 인해 빠른 증폭력을 갖게 된다.

○ 등온증폭의 특징

- 4개의 primer를 사용하므로 specificity와 sensitivity가 매우 높다. 분자생물학적 방법, multiple, specific primers가 유전자의 특정한 부분에 결합하여, Immuno-PCR 보다 감도와 특이가 높으며, 반복실험 덜 필요하다.
- 기존의 PCR 방법보다도 매우 빠르게 결과를 1시간이내에 확인이 가능하며, 고가의 장비가 불필요한 것이 큰 장점이다. Bst DNA polymerase는 일반 Taq polymerase 보다도 좋은 민감도를 가지고 있으며, 반응 matrix에 영향을 덜 받는다. Isothermal 반응이 continuous amplification 하므로 샘플에 대한 영향을 적게 받아 정확하고 효율이 증대된다.

표 21. PCR과 등온증폭의 비교

구분	일반PCR	등온증폭
Step	Denature-anealing- amplification의 cycle reaction	등온 증폭 (Cycle이 없음)
Primer	2개의 프라이머 반응	4개의 프라이머 반응
반응시간	약 120~ 180분	약 60분
결과	전기영동 및 EtBr 염색 필요	즉시 육안관찰
장비 필요성	PCR 장비, 전기영동 및 gel documentatin system 요구	water bath 필요

- 증폭단계로 넘어감에 따라 증폭과 검출이 동시에 이루어지며, 이는 비특이적인 반응 가능성을 낮추어 높은 민감도와 위양성이 낮은 결과를 보여주게 된다.

(2) Mycotoxin gene 검출을 위한 후보유전자의 검색 및 제작

○ Mycotoxin gene 검출을 위한 후보 유전자의 검색

- *Aspergillus flavus* NRRL3357의 aflP/ omtA/ omt-1/ O-methyltransferase A" (NCBI Reference Sequence: NW_002477243.1), *Penicillium nordicum* strain ITEM 9634 의 ochratoxin A polypetide synthase (pks) gene (GenBank: KP698117.1)를 후보유전자로 하여 유전자를 검색하였다.

○ 등온증폭 프라이머 제작 프로그램을 이용한 프라이머 제작

- (B3), Forward inner primer (FIP), Backward inner primer (BIP))와 2개의 loop primer를 LAMP primer design 프로그램(http://primerexplorer.jp/e/index.html)을 이용하여 제작하였다.

(3) 확보된 primer를 이용한 Isothermal amplification 조건 확립

○ 프라이머 및 조성물의 적정농도 확립

- 총량 25 μl, primers F3와 B3의 최종 농도는 각각 0.2 mM, FIP와 BIP primer 최종

농도는 각각 1.6 mM, LAMP buffer [20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 8 mM $MgSO_4$, 10 mM KCl, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 0.1% Tween 20, and 0.8 M betaine], 1.2 mM dNTPs, 1.0 μl (8.0 U) Bst DNA polymerase, 2 μl template DNA를 기준으로 등온증폭 결과에 맞추어 조성과 양을 조정해 적정 농도를 확립하였다.

그림 73. LAMP primer design 프로그램(http://primerexplorer.jp/e/index.html)

○ Pure culture에서 isolation한 DNA를 이용한 검출 조건 수립

- 조건 수립 시 주의해야 할 점

·· Bst DNA polymerase를 이용한 반응이 실패하는 가장 많은 이유는 온도와 matrix 조성임. 70°C를 넘는 과정이 있거나 0.1% Triton X -100 혹은 100 μg/ml BSA 등으로도 반응이 저해되는 경우가 있는 것으로 알려져 있음. 따라서 matrix에서 DNA를 추출하는 과정이 매우 중요하다.

·· Bst DNA polymerase가 가장 유리하게 작용하는 경우는 60-65°C의 범위이며, 이것은 DNA Polymerase I 및 Large (Klenow) Fragment의 활성온도보다 높으며, Vent DNA Polymerase보다 낮은 것임. 또한 PCR과 달리 GC rich region을 타겟으로 삼을 수 있다는 강력한 장점이 있으므로 이를 primer 디자인에 이용할 수 있다.

·· 현재 개발된 제품은 60~65°C를 가장 최적으로 하고 있으며 다른 온도에서의 활성은 다음과 같음. 10-15% at 37°C / 30-45% at 50°C / 100% at 60-65°C / 20% at 70°C. 또한 70°C 이상이 될 경우 heat-inactivated 되는 성질이 있으므로 이를 조건 수립에 반영하였다.

(4) 등온증폭을 이용한 mycotoxigenic fungi 진단법 개발

○ 등온증폭법(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)은 기존의 중합효소 연쇄반응법과 유사하지만 기존의 중합효소 연쇄반응이 변성(denaturation), 접합(annealing), 신장(extension)의 세 가지 단계를 거치면서 온도의 변화를 주어야 하는 반면, 일정한 단일 온도에서 접합 및 신장이 가능하다는 특징이 있는 방법이다. 사용한 Primer은 각각 4개의 primer (F3, B3, FIP 및 BIP)와 2개의 loop primer를 LAMP primer design 프로그램(http://primerexplorer.jp/e/index.html)을 이용하여 제작하였다.

○ 등온증폭반응은 DNA 각각 1 ul, 각각 40 pmoles의 FIP와 BIP, 5 pmoles의 F3와 B3, 8 Units의 Bst 2.0 DNA polymerase large fragment(New England BioLabs), 8 mM의 $MgSO_4$ 및 100 x SYBR Green I (Lonza, Switzerland) 2μl를 넣어 총 25ul가 최종 볼륨이 되도록 하고 65℃, 1시간 인큐베이터에서 반응시켰다.

※ Cho HS, Kang JI, Park NY. 2006a. Detection of canine parvovirus in fecal samples using loop-mediated isothermal amplification. J Vet Diagn Invest 18: 81-84.

표 22. LAMP 반응 조건

Components of premix solution	Volume
Bst.10 X reaction buffer (10 mM tris-HCl, 10 mM KCl, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 8mM $MgSO_4$)	2.5 μL
10 mM dNTP mix (2.5 mM each.)	2 μL
Forward (10 pmole/μL)	0.5 μL
Reverse primer (10 pmole/μL)	0.5 μL
FIP (10 pmole/μL)	4 μL
BIP (10 pmole/μL)	4 μL
Bst. polymerase (8 U/μL)	1 μL
Template DNA (25 ng/μL)	1 μL
100 x SYBR Green I	2 μL
Deionized water	7.5 μL
Total	25 μL

(5) 등온증폭을 이용한 Aflatoxin gene 진단법 개발

○ LAMP primer design 프로그램을 이용하여 *Aspergillus flavus* NRRL3357의 aflP/ omtA/ omt-1/ O-methyltransferase A" (NCBI Reference Sequence: NW_002477243.1) gene으로부터 primer(Tm 58℃)를 design하였다.

표 23. Aflatoxin omt 유전자의 등온증폭 프라이머 정보	
aflatoxin omt F3-1	AGAGAACTCCCTCCTCCAC
aflatoxin omt B3-1	CGGTTGCGGTGACGATTG
aflatoxin omt FIP-1	AGGGAACCGGGCCATGAACT-CCTGGGAGATCGTGCGTA
aflatoxin omt BIP-1	CGTTGTCCCATCTCGATAGCGC-GACTAGGTCCGTCCACAATG

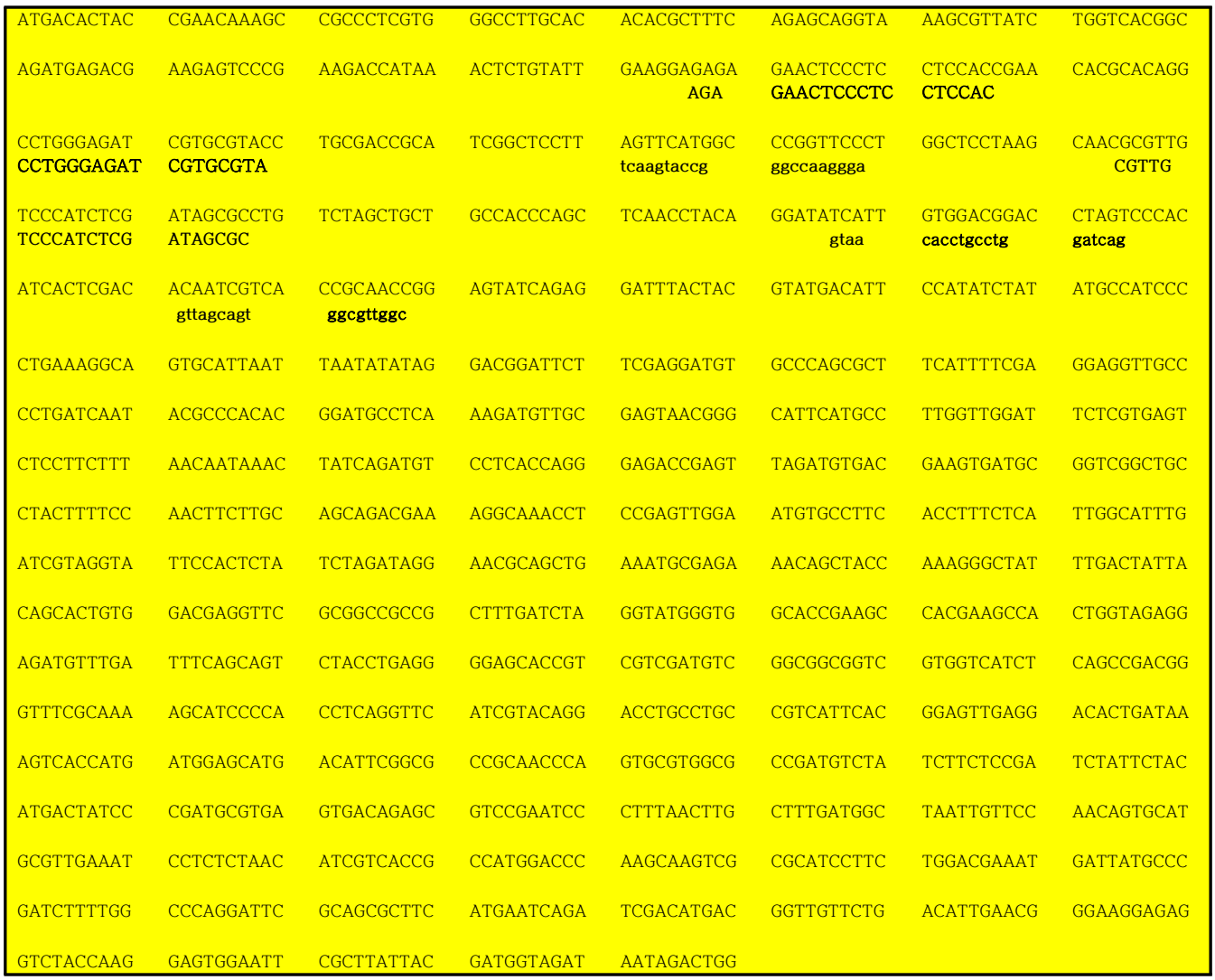


그림 74. *Aspergillus flavus* NRRL3357 aflP/ omtA/ omt-1/ O-methyltransferase A gene 및 primer

○ SYBR Green 형광을 이용한 시료에서의 LAMP 결과 7개의 시료를 대상으로 LAMP 반응을 형광반응으로 확인한 결과, lane 1~3은 으며, Negative control, *Aspergillus niger, P. digitatum* 에서는 형광 및 밴드를 확인할 수 없었다. 양성 반응의 경우 lane 4의 positive control (*Aspergillus flavus* KACC 46449)에서 형광을 확인하였으며 wild type인 lane 5~7에서도 확인할 수 있었다.

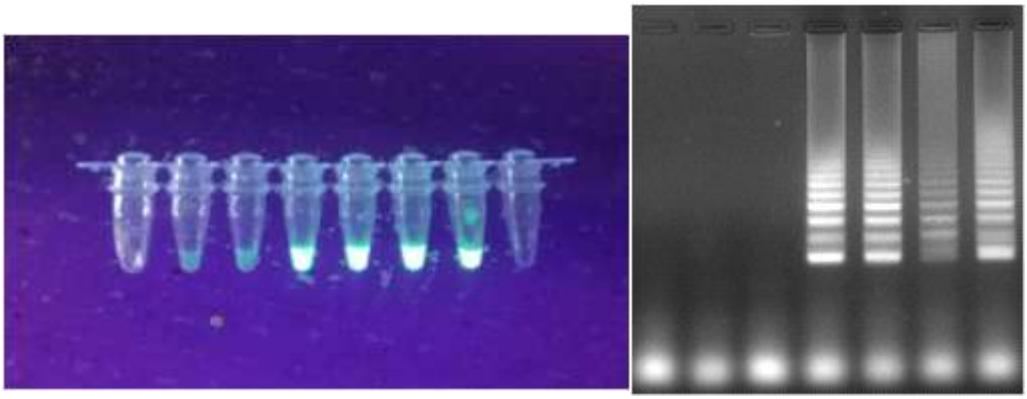


그림75. Results of LAMP assay to detect Aflatoxin gene(nor1). Visualization under UV irradiation : bright fluorescence indicates a positive reaction. 1. Negative control; 2. *Aspergillus niger* KACC 45093; 3. *Penicillium digitatum KACC* 40824; 4.Positive control (*Aspergillus flavus* KACC 46449; 5. Wide type *Aspergillus flavus* 1; 6. Wide type *Aspergillus flavus* 2; 7. Wide type *Aspergillus flavus* 3

(6) 등온증폭을 이용한 진단법 Ochratoxin gene개발

○ LAMP primer design 프로그램을 이용하여 *Penicillium nordicum* strain ITEM 9634 의 ochratoxin A polyketide synthase (pks) gene (GenBank: KP698117.1)으로부터 primer(Tm 55℃)를 design하였다.

표 24. Ochratoxin gene**의 등온증폭 프라이머 정보**

F3	AGTCTCCAGCTATGGCTACG
B3	GGCCAATGTTGTTGCGATAC
FIP	ATTTGTGGGCCGTCTGACTGG-ACAGTTTCGCATGTCATCCT
BIP	ACCGCACGAGAACCGTATCAGT-AGGGCATTGTTCTTTCCGG

CCAGCAATGG CCGAGCTCAG ACGCACCGCG CCGCGCCGGA GTCTCCAGCT ATGGCTACGG AGGAACAGTT TCGCATGTCA
A GTCTCCAGCT ATGGCTACG ACAGTT TCGCATGTCA

TCCTCGAACA GTACACGCCG CCACCATTTG AAGATAAGCA GAGCCAGTCA GACGGCCCAC AAATCCTTCT CTTATCAGCA
TCCT ggtcagt ctgccgggtg ttta A

CCGCACGAGA ACCGTATCAG TGCCCAGGCC AACGTGTTGT CTTTTTGGAT GAATGATGCC GGAAAGAACA ATGCCCTGTC
CCGCACGAGA ACCGTATCAG T gg cctttcttgt tacggga

ACGTATCGCA ACAACATTGG CCATTCGCAG AGGACATCAT ACTCACCGAG CGGCTTTAGT GGTGGACAAC CACCATGATG
catagcgt tgttgtaacc gg

CCATCGAAAA ACTTAGGTCA CTTTCCGAAG ATGTCTCCAC GGAATGGGTC ACGAAGAATC

그림 76. *Penicillium nordicum* strain ITEM 9634 의 ochratoxin A polyketide synthase (pks) gene 및 primer

○ SYBR green 형광반응 LAMP 결과, 1 lane의 경우 negative control은 밴드가 검출되지 않았으나, lane 2의 positive control (*Aspergillus ochraceus* KACC 45186)에서는 형광을 확인하였으며 wild type인 lane 5~6에서도 확인할 수 있었다. 하지만, 6 lane의 *Aspergillus niger* KACC 45093는 검출되지 않았다.

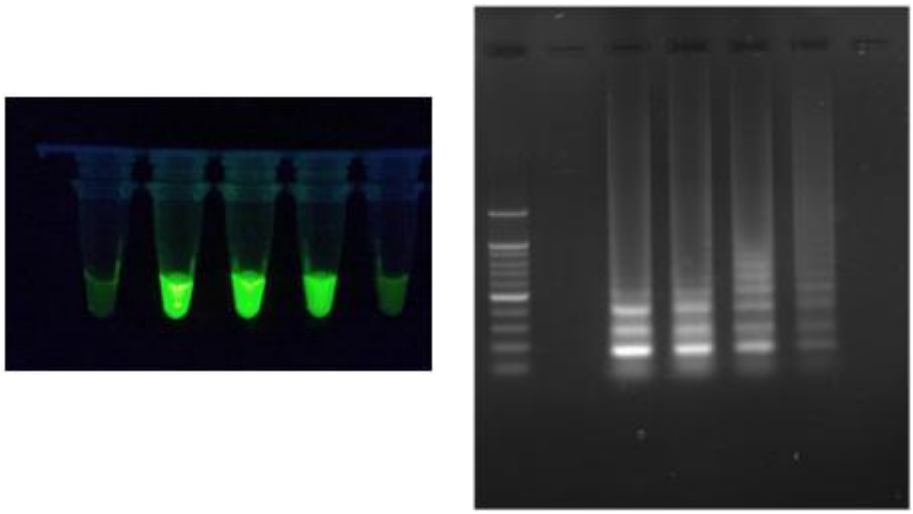


그림 77. Results of LAMP assay to detect ochratoxin A polyketide synthase (pks) gene. Visualization under UV irradiation : bright fluorescence indicates a positive reaction. 1. Negative control; 2.Positive control (*Aspergillus ochraceus* KACC 45186; 3. Wide type *Aspergillus ochraceus* 1; 4. Wide type *Aspergillus ochraceus* 2; 5. Wide type *Aspergillus ochraceus* 3, 6 *Aspergillus niger* KACC 45093

다. Multiplex-PCR(Polymerase Chain Reaction) 개발

○ *Aspergillus* strains, *Penicillium* strains, *Fusarium* strains을 대상으로 nor1 gene (aflatoxin), Tri6 gene(trichothecene), FUM13 gene(fumonisin) 그리고 otanps gene (ochratoxin A)의 동시 검출을 위하여 PCR 방법을 이용하였다.

○ 국립농업과학원 농업유전자원센터 (http://www.genebank.go.kr/) 분양받은 *Aspergillus flavus* KACC 46449, *Fusarium graminearum* KACC 41044, *Aspergillus ochraceus* KACC 45186, *Fusarium proliferatum* KACC 4038 균들을 Potato dextrose agar, Rose bengal Agar로 25℃에 7일 배양한 다음 PCR 실험에 착수하였다.

(1) Genomic DNA 추출

○ DNA 분리. Fungal DNA를 분리하기 위하여 Liu 등의 실험방법을 변형시켜 용하였다. 1.5ml eppendorf tube에 500㎕ lysis buffer (400mM tris-HCl [pH8.0]+60 mM EDTA [pH 8.0], 150 mM NaCl+1% Sodium dodecyl sulfate)에 소량의 mecelia를

넣은 후 상온에서 10분간 방치 하고 pH 4.8로 교정하여 150㎕ potassium acetate를 넣었다. 그리고 나서 10,000 xg로 1분간 원심분리하여 상층액을 다른 eppendorf tube에 넣은 후 다시 원심분리하였다. 그리고 원심분리된 상층액을 eppendorf tube에 넣고 동량의 isopropyl alcohol를 넣은 후 뒤집어서 흔든 후 10,000 xg으로 2분간 원심분리하여 상층액을 버렸다. DNA pellet을 300㎕의 70% ethanol로 세척한 후 10,000 RPM으로 5분간 원심분리하여 상층액을 버리고 DNA pellet을 진공펌프로 건조시켰다. 그리고 50㎕의 3차 증류수에 용해시켰다.

(2) Primer 정보

- Aflatoxin의 대사에 관여하는 nor gene을 대상으로 하였으며, *Aspergillus flavus* 등 *Aspergillus* strains에서 생산하는 aflatoxin를 확인하기 위한 유전자이며, Tri6 and FUM13-positive *Fusarium* strains을 중심으로 Tri6 gene은 trichothecene mycotoxin (Deoxynivalenone, Nivalenone), FUM13 gene은 fumonisin을 검출하기 위한 유전자를 사용하였고, otanps 유전자는 *ochratoxin* A를 확인하기 위한 유전자로 사용하였다.
- Genebank M_003455와 Genebank M_003474의 염기서열을 Appliedbiosystems의 Primer express 3.0을 사용하여 nor1 primer와 fum 13 primer를 제작하였다. 또한 tri 6 primer는 Ramana et al 논문을 인용하고, otanps primer는 Bogs et al 논문을 참조하였다.

표 25. 곰팡이 독소 검출 PCR Primers

Primer name	Primer sequence (5′–3′)	Gene targeted	Amplicon size (bp)	References
nor1 F	CGCTACGCCGGCACTCTCGGAG	nor1	396	본 연구
nor1 R	GGCCGCCAGCTTCGACACTCCC			
tri6 F	GATCTAAACGACTATGAATCACC	Tri6	541	Ramana et al. 2011
tri6 R	GCCTATAGTGATCTCGCATGT			
otanps F	AGTCTTCGCTGGGTGCTTCC	otanps	750	Bogs et al. 2006
otanps R	CAGCACTTTTCCCTCCATCTATCC			
fum 13 F	GCTTGTCCTTCTCACTGG	FUM13	982	본 연구
fum 13 R	GCCGACATCATAATCAGT			

Ramana, M.V., Balakrishna, K., Murali, H.S. and Batra, H.V., 2011, Multiplex PCR-based strategy to detect contamination with mycotoxigenic Fusarium species in rice and finger millet collected from Southern India. J Sci Food Agric 91, 1666-11673.

Bogs, C., Battilani, P. and Geisen, R. (2006) Development of a molecular detection a differentiation system for ochratoxin A producing Penicillium species and its application to analyse the occurrence of Penicillium nordicum in cured meats. Int J Food Microbiol 107, 39-347.

(3) PCR 조건

○ PCR 반응은 초기변성 94℃에서 4분간, 변성은 94℃에서 1분, 결합은 58℃에서 1분, 신장은 72℃에서 1분간 35 cycle로, 마지막 최종신장은 72℃에서 8분간 진행시켰다. PCR 산물은 1x TAE buffer를 이용한 1.2% 아가로즈겔 150 ㎖에 nucleic acid gel stain (Biointron, Korea) 4 ㎕을 넣어 80분간 전기영동 하였으며, UV하에서 밴드를 확인하였다.

표 26. 곰팡이 독소 PCR 반응 조건

구분	온도	시간	cycle 수
초기변성	94℃	4분	1 cycle
변성(denaturation) 결합(annealing) 신장(extension)	94℃ 58℃ 72℃	1분 1분 1분	35 cycle
최종신장(elongation)	72℃	8분	1 cycle
보존	4℃	-	-

(4) PCR 결과

- PCR을 이용하여 aflatoxin, ochratoxin, fumonisin, Deoxynivalenone, Nivalenone 유전자를 동시 검출하기 위해서 표준 균주인 *Aspergillus flavus* KACC 46449, *Fusarium graminearum* KACC 41044, *Aspergillus ochraceus* KACC 45186, *Fusarium proliferatum* KACC 4038 균들에게서 genomic DNA를 추출한 다음 각각을 template로 PCR을 수행하였다(그림참조).
- *Aspergillus flavus* KACC 46449의 nor1 gene을 PCR 분석 수행하여 396 bp에서 결과가 나옴을 확인하였으며, *Fusarium graminearum* KACC 41044에서 확인될 수 있는 tri6 gene, *Aspergillus ochraceus* KACC 45186 균에서 확인 가능한 otanps gene 그리고 *Fusarium proliferatum* KACC 4038에서의 FUM13 gene을 확인을 위한 982 bp을 확인하였다.

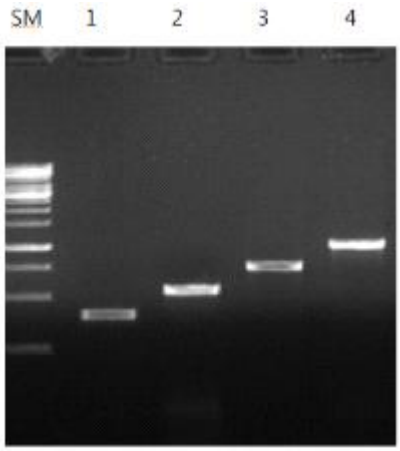


그림 78. Agarose gell electrophoresis patterns of PCR amplicons. SM: size marker ; lane 1: nor1 gene (*Aspergillus flavus* KACC 46449); lane2: tri6 gene(*Fusarium graminearum* KACC 41044) ; lane 3: otanps gene (*Aspergillus ochraceus* KACC 45186; lane 4: FUM13 gene(*Fusarium proliferatum* KACC 40387)

(5) 콩에서의 PCR 결과 확인

- 시중판매 콩제품 20종에 오염된 곰팡이균의 유전자를 통하여 확인하고자 하였다. 10g 시료를 1% sodium hypochlorite에 2분간 침지하여 표면 살균하였다. 표면 소독된 낟알들은 살균수로 2회 세척한 뒤 멸균된 여과지에서 물기를 제거한 후 10개씩 PDA(Potato Dextrose Agar, streptomycin 600 μg/ml)에 치상하였다. 균사체가 형성된 곰팡이 genomic DNA를 추출한 다음 PCR 반응을 하였다.
- 대부분의 유전자가 Tri6 gene가 검출되었으며 trichothecene mycotoxin (Deoxy-nivalenone, Nivalenone)인 541bp에서 보였다.
- 향후 검출된 유전자와 이에 대한 발현되는 곰팡이 독소 종류, 독소량 및 곰팡이 동정 등을 통해 곰팡이와 독소유전자와 발현양상을 확인할 계획이다.

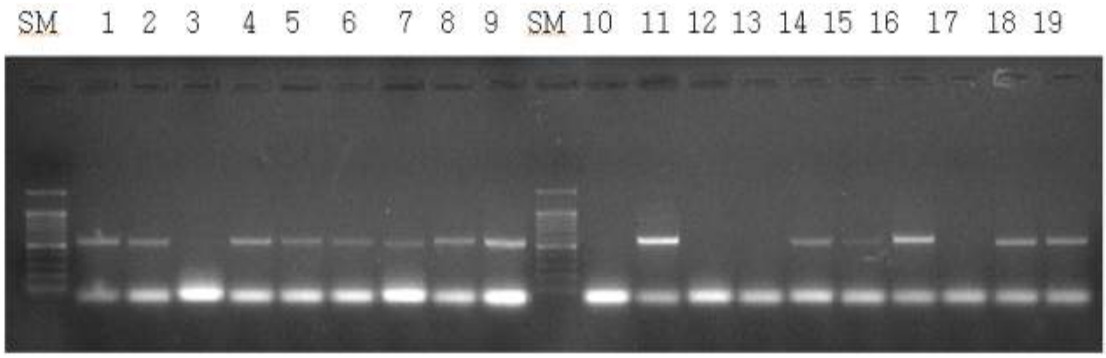


그림 79. Results of PCR assay to detect mycotoxin genes. SM : Size marker 100bp ladder, 1 lane: s-1, 2 lane; s-2, 3 lane; s-3, 4 lane; s-4, 5 lane; s-5, 6 lane; s-6, 7 lane; s-7, 8 lane;8-2, 9 lane;9, 10 lane;10-1, 11 lane;10-2, 12 lane;12, 13 lane;13, 14 lane;14-1, 15 lane;14-2, 16 lane;16-1, 17 lane;c12, 18 lane;c13, 19 lane;c14

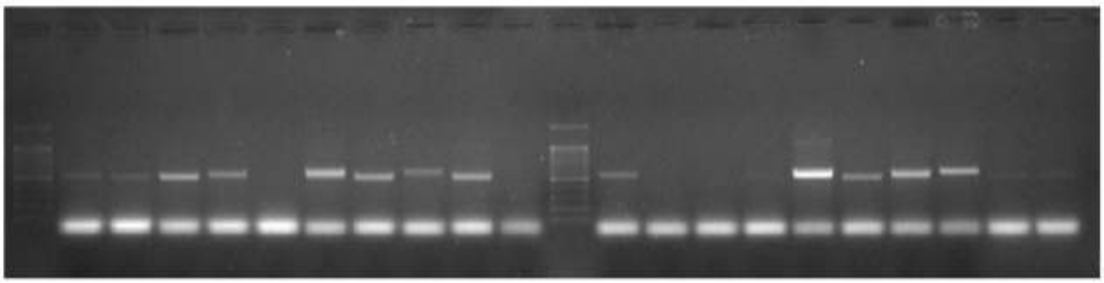


그림 80. Results of PCR assay to detect mycotoxin genes. SM : Size marker 100bp ladder, 1 lane:c16, 2 lane;c16-1, 3 lane:c16-2, 4 lane;c18, 5 lane;c28, 6 lane:c33, 7 lane;c36, 8 lane:c40, 9 lane:c42, 10 lane;c43-1, 11 lane;c5, 12 lane:c6, 13 lane:c8,
14 lane:c24, 15 lane:c26, 16 lane:c27, 17 lane:c21, 18 lane:c49, 19 lane:c19-1, 20 lane: s-8

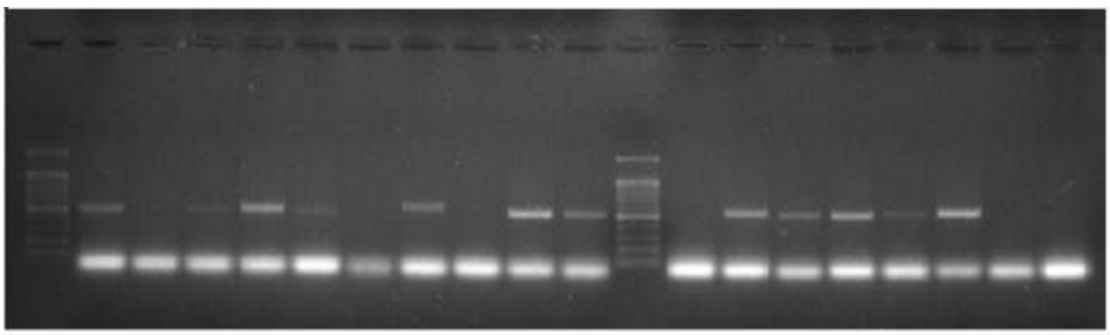


그림 81. Results of PCR assay to detect mycotoxin genes. SM : Size marker 100bp ladder, 1 lane: c43-2, 2 lane; s-9, 3 lane:2, 4 lane;4, 5 lane:8-1, 6 lane;31-2, 7 lane;31-3, 8 lane;32-1, 9 lane;32-2, 10 lane;33, 11 lane;45, 12 lane;49, 13 lane;26-1, 14 lane;26-2, 15 lane;27, 16 lane;16-2 17 lane;20 18 lane;24 19 lane; c30, 20 lane; 28

3. 농산물 및 가공식품에서의 mycotoxigenic fungi 및 mycotoxin 오염 조사

가. LC 및 LC-MS/MS를 이용한 mycotoxin 분석

(1) 시험방법(식품공전, 2015)

(나) 아플라톡신(B_1, B_2, G_1 및 G_2)

1) 박층크로마토그래피에 의한 시험

○ 분석원리: 검체 중의 아플라톡신(B_1, B_2, G_1 및 G_2)을 메탄올로 추출하고 헥산으로 지용성 성분을 제거한 후 칼럼크로마토그래피를 이용하여 정제한 것을 박층크로마토그래피로 전개하고 자외선(365nm)을 조사하여 표준품과 같은 위치에 형광 및 Rf 값을 확인하였다.

2) 액체크로마토그래피에 의한 시험

○ 분석원리: 검체 중의 아플라톡신(B_1, B_2, G_1 및 G_2)을 70% 메탄올로 추출한 후 면역친화성컬럼으로 정제하여 트리플루오로초산(trifluoroacetic acid)으로 유도체화 시킨 것을 형광검출기가 부착된 액체크로마토그래프로 분석하였다.

3) 오크라톡신 A(Ochratoxin A)

○ 분석원리: 검체 중의 오크라톡신 A를 추출용매로 추출, 여과한 것을 면역친화성컬럼으로 정제시키고 액체크로마토그래프로 분석하였다.

4) 데옥시니발레놀(Deoxynivalenol)

○ 분석원리: 시료 중의 데옥시니발레놀을 물로 추출한 후 면역친화성컬럼으로 정제하여 자외선 검출기가 부착된 액체크로마토그래프로 분석하였다.

5) 제랄레논(Zearalenone)

○ 분석원리: 시료 중의 제랄레논을 75% 아세토니트릴로 추출한 후 면역친화성컬럼으로 정제하여 형광검출기가 부착된 액체크로마토그래프로 분석하였다.

(2) 식품 중 곰팡이독소 시험

(가) 표준물질 및 시약

1) 표준물질

○ Aflatoxin B_1, B_2, G_1, G_2, Ochratoxin A, Zearalenone, 그리고 Deoxynivalenol는 Romer사(99.9%, MO, USA) 그리고 R-biopharm(99.9%, Scottland)에서 구입하였다. 표준인증물질인 FA-04239, FA-04240, FA-22106, FA-22109, QC-04237, QC-04244, QC-04209, QC-04206, QC-04196는 Fera(Fapas, UK)에서 구입하여 사용하였다.

2) 시약

○ Acetonitrile, Methanol, Ethyl acetate, Diethy1 ether 및 Water는 Merck사(Darmsstadt, Germany)의 HPLC급 고순도 용매를 Formic acid와 Acetic acid, Ammonium formate, Ammonium acetate, Sodium bicarbonate, Sodium chloride, Tween 20, 그리고 PBS buffer는 Sigma-Aldrich사 (MO, USA)로부터 1급 시약을 구입하여 사용하였다. 기타 모

든 시약은 특급 또는 분석용을 사용하였다.

(나) 시험기구 및 분석기기

1) 실험기기

- HPLC : Shiseido nanospace SI-2 (Shiseido, Japan)
- HPLC : Dionex Ultimate 3000 (Dionex, USA)
- HPLC : Thermo Scientific Surveyor HPLC system (Thermo, USA)
- MS/MS : TSQ Quantun Ultra (Thermo, USA)
- UV/Vis photospectrometry

(다) 표준용액 조제

1) 표준원액(Stock standard solution) 조제

○ 아플라톡신 표준원액은 아플라톡신 B_1, B_2, G_1, G_2 표준품을 각각 Acetonitrile 1 mL을 넣어 100 μg/mL를 만들었다. 오크라톡신 A 표준원액은 Toluene:Acetic acid(99:1, v/v) 1 mL을 넣어 100 μg/mL를 만들었다. 데옥시니발레놀의 표준원액은 Acetonitrile 1 mL을 넣어 100 μg/mL를 만들었다. 제랄레논 표준원액은 Acetonitrile 1 mL을 넣어 100 μg/mL를 만들었다. 파튤린의 표준원액은 ethyl acetate 1 mL을 넣어 100 μg/mL를 넣어 표준원액을 만들었다.

2) 표준용액(Stock standard solution) 조제

○ 아플라톡신 표준용액은 아플라톡신 B_1, B_2, G_1, G_2 표준원액을 각각 0.1 mL 취하여 Acetonitrile 0.9 mL을 넣어 10 μg/mL를 만들었다. 오크라톡신 A 표준용액은 표준원액 0.1 mL 취하여 질소 건조 후에 Acetonitrile 1 mL을 넣어 10 μg/mL를 만들었다. 데옥시니발레놀과 제랄레논 표준용액은 각각 표준원액 0.1 mL 취하여 Acetonitrile 0.9 mL을 넣어 10 μg/mL를 만들었다.

3) 시료 전처리

○ 검체를 분쇄하여 균질화한 시료 5 g을 정밀히 달아 추출용매 20 mL를 가하고 3,500rpm, 5분간 고속원심분리 후 이를 유리섬여과지(GF/A)로 여과하였다. 여액 4 mL을 취하여 DW 16 mL을 넣어 20 mL을 만든다. ACN 2 mL, DW 2 mL로 활성화 시킨 ISOLUTE cartridge에 희석액 5 mL을 통과시킨 후 DW 2 mL, 10% ACN 2 mL로 세척하였다. 이후 0.1% formic acid in ACN 2 mL과 MeOH 2 mL을 차례대로 흘려 용출 시킨 후 50℃에서 질소 건고하여 0.1% formic acid with 50% MeOH 1 mL로 녹여 이를 0.2㎛ syringe filter로 여과한 것을 시험용액으로 하였다. 여과한 액 5 μL을 주입하여 LC-MS/MS로 분석하였다.

4) 회수율 측정용 시료 전처리

○ 검체를 분쇄하여 균질화한 시료 5 g을 정밀히 달아 저농도는 아플라톡신 B_1, B_2, G_1 200 ng/mL, 0.1 mL, 아플라톡신 G_2, 오크라톡신 A는 1 μg/mL 0.004 mL, 그리고 제랄레논은 10 μg/m 0.04 mL, 중농도는 아플라톡신 B_1, B_2, G_1 1 μg/mL 0.05 mL, 아플라톡신 G_2, 오크라톡신 A는 1 μg/mL 0.1 mL, 그리고 제랄레논은 10 μg/mL

0.1 mL, 고농도는 아플라톡신 B_1, B_2, G_1 1 μg/mL 0.1 mL, 아플라톡신 G_2, 오크라톡신 A는 1 μg/mL 0.2 mL, 그리고 제랄레논은 10 μg/mL 0.2 mL을 spiking하여 방치하였다. 추출 용매 20 mL를 가하고 3,500 rpm, 5분간 고속원심분리 후 이를 유리섬 여과지(GF/A)로 여과하였다. 여액 4 mL을 취하여 DW 16 mL을 넣어 20 mL을 만든다. ACN 2 mL, DW 2mL로 활성화 시킨 ISOLUTE cartridge에 희석액 5 mL을 통과시킨 후 DW 2 mL, 10% ACN 2 mL로 세척하였다. 이후 0.1% formic acid in ACN 2 mL과 MeOH 2 mL을 차례대로 흘려 용출시킨 후 50℃에서 질소 건조하여 0.1% formic acid with 50% MeOH 1 mL로 녹여 이를 0.2 μm syringe filter로 여과한 것을 시험용액으로 하였다. 여과한액 5 μL을 주입하여 LC-MS/MS로 분석하였다.

(3) Mycotoxin 확인 시험 결과

(가) 견과류 등 농산물 시험결과

○ 수입 견과류 9개 품목 80개 제품에 대한 아플라톡신 분석결과, 2개 제품에서 검출되었으며, 1개 제품은 잔류허용기준을 초과하였다. 베트남산 땅콩 3개 제품 중 1개에서 아플라톡신이 16.45μg/kg (B_1 : 15.27 μg/kg, B_2 : 1.18 μg/kg) 검출되어 견과류의 총 아플라톡신 허용기준인 15 μg/kg을 초과하였다. 미국산 아몬드 13개 중 1개에서 아플라톡신이 8.77μg/kg(Aflatoxin B_1만 검출) 검출되었으나 기준치 이내이다.

표 27. 견과류 시험결과 (I)

순번	총아플라톡신 (μg/kg)	오크라톡신A (μg/kg)	제랄레논 (μg/kg)	데옥시니발레놀 (μg/kg)
1	불검출	불검출	불검출	불검출
2	불검출	불검출	불검출	불검출
3	불검출	불검출	불검출	불검출
4	불검출	불검출	불검출	불검출
5	불검출	불검출	불검출	불검출
6	불검출	불검출	불검출	불검출
7	불검출	불검출	불검출	불검출
8	불검출	불검출	불검출	불검출
9	불검출	불검출	불검출	불검출
10	불검출	불검출	불검출	불검출
11	불검출	불검출	불검출	불검출
12	불검출	불검출	불검출	불검출
13	불검출	불검출	불검출	불검출
14	불검출	불검출	불검출	불검출
15	불검출	불검출	불검출	불검출
16	불검출	불검출	불검출	불검출
18	불검출	불검출	불검출	불검출
19	불검출	불검출	불검출	불검출
20	불검출	불검출	불검출	불검출
21	불검출	불검출	불검출	불검출
22	**8.77 (아플라톡신B_1)**	불검출	불검출	불검출
23	불검출	불검출	불검출	불검출
24	불검출	불검출	불검출	불검출
25	불검출	불검출	불검출	불검출
26	불검출	불검출	불검출	불검출
27	불검출	불검출	불검출	불검출
28	불검출	불검출	불검출	불검출
29	불검출	불검출	불검출	불검출
30	불검출	불검출	불검출	불검출

31	불검출	불검출	불검출	불검출
32	불검출	불검출	불검출	불검출
33	불검출	불검출	불검출	불검출
34	불검출	불검출	불검출	불검출
35	불검출	불검출	불검출	불검출
36	불검출	불검출	불검출	불검출
37	불검출	불검출	불검출	불검출
38	불검출	불검출	불검출	불검출
39	불검출	불검출	불검출	불검출
40	불검출	불검출	불검출	불검출
41	불검출	불검출	불검출	불검출
42	불검출	불검출	불검출	불검출
43	불검출	불검출	불검출	불검출
44	불검출	불검출	불검출	불검출
45	불검출	불검출	불검출	불검출
46	불검출	불검출	불검출	불검출
47	불검출	불검출	불검출	불검출
48	불검출	불검출	불검출	불검출
49	불검출	불검출	불검출	불검출
50	불검출	불검출	불검출	불검출
51	불검출	불검출	불검출	불검출
52	불검출	불검출	불검출	불검출
53	불검출	불검출	불검출	불검출
54	불검출	불검출	불검출	불검출
55	불검출	불검출	불검출	불검출
56	불검출	불검출	불검출	불검출
57	불검출	불검출	불검출	불검출
58	(아플라톡신 B1) 15.27 (아플라톡신 B2) 1.18 *총아플라톡신 :16.45	불검출	불검출	불검출
59	불검출	불검출	불검출	불검출
60	불검출	불검출	불검출	불검출
61	불검출	불검출	불검출	불검출
62	불검출	불검출	불검출	불검출
63	불검출	불검출	불검출	불검출
64	불검출	불검출	불검출	불검출
65	불검출	불검출	불검출	불검출
66	불검출	불검출	불검출	불검출
67	불검출	불검출	불검출	불검출
68	불검출	불검출	불검출	불검출
69	불검출	불검출	불검출	불검출
70	불검출	불검출	불검출	불검출
71	불검출	불검출	불검출	불검출
72	불검출	불검출	불검출	불검출
73	불검출	불검출	불검출	불검출
74	불검출	불검출	불검출	불검출
75	불검출	불검출	불검출	불검출
76	불검출	불검출	불검출	불검출
77	불검출	불검출	불검출	불검출
78	불검출	불검출	불검출	불검출
79	불검출	불검출	불검출	불검출
80	불검출	불검출	불검출	불검출

(나) 견과류 곰팡이 독소 2차 시험결과

○ 시장 유통 중인 견과류로 포장 및 비포장 제품 12품목 116종으로, 건포도(8종), 땅콩(28종), 땅콩가루(3종), 로스티드피넛(4종), 마카다미아(1종), 무화과(8종), 아몬드(14종), 캐슈너트(11종), 피스타치오(11종), 해바라기씨(10종), 호두(10종), 호박씨(8종),를 확인하였다.

○ 아플라톡신 (Aflatoxin)은 시험 대상제품인 견과류 12품목 116종 중 115종은 불검출 또는 기준치 이하를 나타냈으나 로스티드피넛 1종에서 기준치 10 ppb의 약 8배 (83 ppb)에 이

르는 아플라톡신 B_1이 검출되었다.

표 28. 견과류 시험결과 (II)

종류		총아플라톡신 (μg/kg)	오크라톡신A (μg/kg)	제랄레논 (μg/kg)	데옥시니발레놀 (μg/kg)
건포도		불검출	불검출	불검출	불검출
		불검출	불검출	불검출	불검출
		불검출	불검출	불검출	불검출
		불검출	불검출	불검출	불검출
		불검출	불검출	불검출	불검출
		불검출	불검출	불검출	불검출
		불검출	불검출	불검출	불검출
		불검출	불검출	불검출	불검출
땅콩		불검출	불검출	불검출	불검출
		불검출	불검출	불검출	불검출
		불검출	불검출	불검출	불검출
		불검출	불검출	불검출	불검출
		불검출	불검출	불검출	불검출
		불검출	불검출	불검출	불검출
		불검출	불검출	불검출	불검출
		불검출	불검출	불검출	불검출
		불검출	불검출	불검출	불검출
		불검출	불검출	불검출	불검출
		불검출	불검출	불검출	불검출
		불검출	불검출	불검출	불검출
		불검출	불검출	불검출	불검출
		불검출	불검출	불검출	불검출
		불검출	불검출	불검출	불검출
		불검출	불검출	불검출	불검출
		불검출	불검출	불검출	불검출
		불검출	불검출	불검출	불검출
		불검출	불검출	불검출	불검출
		불검출	불검출	불검출	불검출
		불검출	불검출	불검출	불검출
		불검출	불검출	불검출	불검출
땅콩	땅콩	불검출	불검출	불검출	불검출
	땅콩	불검출	불검출	불검출	불검출
	땅콩	불검출	불검출	불검출	불검출
	땅콩	불검출	불검출	불검출	불검출
	땅콩	불검출	불검출	불검출	불검출
	땅콩	불검출	불검출	불검출	불검출
땅콩가루	땅콩	불검출	불검출	불검출	불검출
	땅콩	불검출	불검출	불검출	불검출
	땅콩	불검출	불검출	불검출	불검출
로스티드피넛	로스티드피넛	검출 (83 μg/kg)	불검출	불검출	불검출
	로스티드피넛	불검출	불검출	불검출	불검출
	로스티드피너츠	불검출	불검출	불검출	불검출
	로스티드피너츠	불검출	불검출	불검출	불검출
	마카다미아	불검출	불검출	불검출	불검출
무화과	무화과	불검출	불검출	불검출	불검출
	건무화과	불검출	불검출	불검출	불검출
	건무화과	불검출	불검출	불검출	불검출
	무화과	불검출	불검출	불검출	불검출
	무화과	불검출	불검출	불검출	불검출
	무화과	불검출	불검출	불검출	불검출
	무화과	불검출	불검출	불검출	불검출
	무화과	불검출	불검출	불검출	불검출
아몬드	아몬드	불검출	불검출	불검출	불검출
	아몬드	불검출	불검출	불검출	불검출
	아몬드	불검출	불검출	불검출	불검출

	아몬드	불검출	불검출	불검출	불검출
	아몬드	불검출	불검출	불검출	불검출
	아몬드	불검출	불검출	불검출	불검출
	아몬드	불검출	불검출	불검출	불검출
	아몬드	불검출	불검출	불검출	불검출
	아몬드	불검출	불검출	불검출	불검출
호두	호두	불검출	불검출	불검출	불검출
	호두	불검출	불검출	불검출	불검출
	호두	불검출	불검출	불검출	불검출
	호두	불검출	불검출	불검출	불검출
	호두	불검출	불검출	불검출	불검출
	호두	불검출	불검출	불검출	불검출
	호두	불검출	불검출	불검출	불검출
	호두	불검출	불검출	불검출	불검출
	호두	불검출	불검출	불검출	불검출
	호두	불검출	불검출	불검출	불검출
캐슈너트	캐슈넛	불검출	불검출	불검출	불검출
	캐슈넛	불검출	불검출	불검출	불검출
	캐슈넛	불검출	불검출	불검출	불검출
	캐슈넛	불검출	불검출	불검출	불검출
	캐슈넛	불검출	불검출	불검출	불검출
	캐슈넛	불검출	불검출	불검출	불검출
	캐슈넛	불검출	불검출	불검출	불검출
	캐슈넛	불검출	불검출	불검출	불검출
아몬드	아몬드	불검출	불검출	불검출	불검출
	아몬드	불검출	불검출	불검출	불검출
	아몬드	불검출	불검출	불검출	불검출
	아몬드	불검출	불검출	불검출	불검출
캐슈너트	캐슈넛	불검출	불검출	불검출	불검출
	캐슈넛	불검출	불검출	불검출	불검출
	캐슈넛	불검출	불검출	불검출	불검출
	캐슈넛	불검출	불검출	불검출	불검출
	캐슈넛	불검출	불검출	불검출	불검출
	캐슈넛	불검출	불검출	불검출	불검출
	캐슈넛	불검출	불검출	불검출	불검출
	캐슈넛	불검출	불검출	불검출	불검출
	캐슈넛	불검출	불검출	불검출	불검출
	캐슈넛	불검출	불검출	불검출	불검출
	캐슈넛	불검출	불검출	불검출	불검출
피스타치오	피스타치오	불검출	불검출	불검출	불검출
	피스타치오	불검출	불검출	불검출	불검출
	피스타치오	불검출	불검출	불검출	불검출
	피스타치오	불검출	불검출	불검출	불검출
	피스타치오	불검출	불검출	불검출	불검출
	피스타치오	불검출	불검출	불검출	불검출
	피스타치오	불검출	불검출	불검출	불검출
	피스타치오	불검출	불검출	불검출	불검출
	피스타치오	불검출	불검출	불검출	불검출
	피스타치오	불검출	불검출	불검출	불검출
	피스타치오	불검출	불검출	불검출	불검출
해바라기씨	해바라기씨	불검출	불검출	불검출	불검출
	해바라기씨	불검출	불검출	불검출	불검출
	해바라기씨	불검출	불검출	불검출	불검출
	해바라기씨	불검출	불검출	불검출	불검출
	해바라기씨	불검출	불검출	불검출	불검출
	해바라기씨	불검출	불검출	불검출	불검출
	해바라기씨	불검출	불검출	불검출	불검출
	해바라기씨	불검출	불검출	불검출	불검출
	해바라기씨	불검출	불검출	불검출	불검출

(다) 이유식 제품

○ 조사대상 30개 제품의 총 아플라톡신 함량, 오크라톡신 A 함량, 데옥시니발레놀 함량, 제랄레논 함량 시험검사 결과, 전 제품이 정량한계 미만으로 검출되었다. 진균도 검출되지는 않았으며 가열하면서 조리하는 형태의 제품으로 검출되지 않은 것으로 보인다.

표 29. 이유식 곰팡이 독소 시험결과

순번	총아플라톡신 (μg/kg)	오크라톡신A (μg/kg)	제랄레논 (μg/kg)	데옥시니 발레놀 (μg/kg)
1	불검출	불검출	불검출	불검출
2	불검출	불검출	불검출	불검출
3	불검출	불검출	불검출	불검출
4	불검출	불검출	불검출	불검출
5	불검출	불검출	불검출	불검출
6	불검출	불검출	불검출	불검출
7	불검출	불검출	불검출	불검출
8	불검출	불검출	불검출	불검출
9	불검출	불검출	불검출	불검출
10	불검출	불검출	불검출	불검출
11	불검출	불검출	불검출	불검출
12	불검출	불검출	불검출	불검출
13	불검출	불검출	불검출	불검출
14	불검출	불검출	불검출	불검출
15	불검출	불검출	불검출	불검출
16	불검출	불검출	불검출	불검출
17	불검출	불검출	불검출	불검출
18	불검출	불검출	불검출	불검출
19	불검출	불검출	불검출	불검출
20	불검출	불검출	불검출	불검출
21	불검출	불검출	불검출	불검출
22	불검출	불검출	불검출	불검출
23	불검출	불검출	불검출	불검출
24	불검출	불검출	불검출	불검출
25	불검출	불검출	불검출	불검출
26	불검출	불검출	불검출	불검출
27	불검출	불검출	불검출	불검출
28	불검출	불검출	불검출	불검출
29	불검출	불검출	불검출	불검출
30	불검출	불검출	불검출	불검출

※ 1. LOQ 가. 곰팡이독소 : 아플라톡신 0.1μg/kg, 오크라톡신A 0.5μg/kg, 제랄레논 20μg/kg, 데옥시니발레놀 20μg/kg

(마) 생식·선식 제품 시험 결과

○ 생식·선식은 주원료가 곡류이므로 곰팡이 균에 오염되어 곰팡이 독소가 생성될 가능성이 높은 식품군임에도 불구하고 식품공전에 곰팡이 독소 개별기준이 마련되어 있지 않은 실정이다. 곡류를 주원료로 사용하는 생식·선식 30개 제품을 대상으로 곰팡이 독소(아플라톡신, 오클라톡신A, 제랄레논) 오염여부를 시험 검사한 결과, 13개 제품에서 제랄레논(zearalenone)이 검출되었다.

○ 13개 생식·선식 제품의 제랄레논 검출농도는 20.85~85.21μg/kg 수준으로 국내 곡류 및 곡류가공품의 제랄레논 허용기준치(200μg/kg)이하 수준이다. 그러나 제랄레논이 검출된 13개 전 제품이 유럽연합(EU)의 밀가루 제랄레논 기준치(20μg/kg)를 상회하고, 3개 제품은 생식·선식과 같은 곡류가공품 허용기준(75μg/kg)을 초과하였다. 아플라톡신(Aflatoxin B_1·B_2·G_1·G_2의 총합, Aflatoxin B_1)과 오클라톡신A (ochratoxin A)는 전 제품에서 검출되지 않았다.

표 30. 생식·선식 시험결과

순번	총아플라톡신 (μg/kg)	오크라톡신A (μg/kg)	제랄레논 (μg/kg)	데옥시니발레놀 (μg/kg)
1	불검출	불검출	불검출	불검출
2	불검출	불검출	불검출	불검출
3	불검출	불검출	불검출	불검출
4	불검출	불검출	불검출	불검출
5	불검출	불검출	검출 (28.12)	불검출
6	불검출	불검출	불검출	불검출
7	불검출	불검출	불검출	불검출
8	불검출	불검출	검출 (54.39)	불검출
9	불검출	불검출	검출 (83.08)	불검출
10	불검출	불검출	불검출	불검출
11	불검출	불검출	검출 (33.92)	불검출
12	불검출	불검출	불검출	불검출
13	불검출	불검출	검출 (20.85)	불검출
14	불검출	불검출	불검출	불검출
15	불검출	불검출	불검출	불검출
16	불검출	불검출	불검출	불검출
17	불검출	불검출	불검출	불검출
18	불검출	불검출	검출 (33.02)	불검출
19	불검출	불검출	불검출	불검출
20	불검출	불검출	검출 (33.35)	불검출
21	불검출	불검출	검출 (24.57)	불검출
22	불검출	불검출	검출 (85.21)	불검출
23	불검출	불검출	불검출	불검출
24	불검출	불검출	검출 (49.96)	불검출
25	불검출	불검출	불검출	불검출
26	불검출	불검출	검출 (60.56)	불검출
27	불검출	불검출	불검출	불검출
28	불검출	불검출	검출 (82.40)	불검출
29	불검출	불검출	불검출	불검출
30	불검출	불검출	검출 (41.77)	불검출

(바) 어분 제품의 곰팡이 독소 확인

○ 어분 30개 제품을 조사하여 곰팡이 독소를 확인한 결과, 2개 제품에서 아플라톡신이 검출되었으며, 나머지 28개 제품은 검출되지 않았다. 오크라톡신, 제랄레논, 데옥시니발레놀은 검출되지 않았다.

표 31. 어분 시험결과

순번	총아플라톡신 (μg/kg)	오크라톡신A (μg/kg)	제랄레논 (μg/kg)	데옥시니발레놀 (μg/kg)
1	불검출	불검출	불검출	불검출
2	불검출	불검출	불검출	불검출
3	불검출	불검출	불검출	불검출
4	불검출	불검출	불검출	불검출
5	불검출	불검출	불검출	불검출
6	불검출	불검출	불검출	불검출
7	10.1	불검출	불검출	불검출
8	불검출	불검출	불검출	불검출
9	불검출	불검출	불검출	불검출
10	불검출	불검출	불검출	불검출
11	불검출	불검출	불검출	불검출
12	불검출	불검출	불검출	불검출
13	불검출	불검출	불검출	불검출

14	불검출	불검출	불검출	불검출
15	불검출	불검출	불검출	불검출
16	불검출	불검출	불검출	불검출
17	불검출	불검출	불검출	불검출
18	13.2	불검출	불검출	불검출
19	불검출	불검출	불검출	불검출
20	불검출	불검출	불검출	불검출
21	불검출	불검출	불검출	불검출
22	불검출	불검출	불검출	불검출
23	불검출	불검출	불검출	불검출
24	불검출	불검출	불검출	불검출
25	불검출	불검출	불검출	불검출
26	불검출	불검출	불검출	불검출
27	불검출	불검출	불검출	불검출
28	불검출	불검출	불검출	불검출
29	불검출	불검출	불검출	불검출
30	불검출	불검출	불검출	불검출

(사) 커피 원두

○ 시중 판매중인 30개 원두 시험결과 7개 제품은 2개 제품에서 아플라톡신이 5.1(㎍/㎏), 6.3(㎍/㎏)각각 검출되었으며, 오크라톡신과 제랄레논, 데옥시니발레놀은 검출되지 않았다.

표 32. 원두 시험결과

순번	제품명	총아플라톡신 (㎍/㎏)	오크라톡신 A (㎍/㎏)	제랄레논 (㎍/㎏)	데옥시니발레놀 (㎍/㎏)
1	커피 원두 1	5.1	불검출	불검출	불검출
2	원두커피 2	불검출	불검출	불검출	불검출
3	원두커피 3	불검출	불검출	불검출	불검출
4	원두커피 4	불검출	불검출	불검출	불검출
5	원두커피 5	불검출	불검출	불검출	불검출
6	원두커피 6	불검출	불검출	불검출	불검출
7	원두커피 7	불검출	불검출	불검출	불검출
8	원두커피 8	불검출	불검출	불검출	불검출
9	원두커피 9	불검출	불검출	불검출	불검출
10	커피 원두 10	6.3	불검출	불검출	불검출
11	원두커피 11	불검출	불검출	불검출	불검출
12	원두커피 12	불검출	불검출	불검출	불검출
13	원두커피 13	불검출	불검출	불검출	불검출
14	원두커피 14	불검출	불검출	불검출	불검출
15	원두커피 15	불검출	불검출	불검출	불검출
16	원두커피 16	불검출	불검출	불검출	불검출
17	원두커피 17	불검출	불검출	불검출	불검출
18	원두커피 18	불검출	불검출	불검출	불검출
19	원두커피 19	불검출	불검출	불검출	불검출
20	원두커피 20	불검출	불검출	불검출	불검출
21	원두커피 21	불검출	불검출	불검출	불검출
22	원두커피 22	불검출	불검출	불검출	불검출
23	원두커피 23	불검출	불검출	불검출	불검출
24	원두커피 24	불검출	불검출	불검출	불검출
25	원두커피 25	불검출	불검출	불검출	불검출
26	원두커피 26	불검출	불검출	불검출	불검출
27	원두커피 27	불검출	불검출	불검출	불검출
28	원두커피 28	불검출	불검출	불검출	불검출
29	원두커피 29	불검출	불검출	불검출	불검출
30	원두커피 30	불검출	불검출	불검출	불검출

(아) 동물 사료

○ 40개 동물사료를 조사하여 7개 제품은 오크라톡신 A가 13.46~40.59(μg/kg) 수준으로 검출되었었으며, 아플라톡신과 제랄레논, 데옥시니발레놀은 검출되지 않았다.

표 33. 동물 사료 시험 결과

순번	사료	총아플라톡신 (μg/kg)	오크라톡신A (μg/kg)	제랄레논 (μg/kg)	데옥시니발레놀 (μg/kg)
1	사료	불검출	40.59	불검출	불검출
2	사료	불검출	24.39	불검출	불검출
3	사료	불검출	20.45	불검출	불검출
4	사료	불검출	16.00	불검출	불검출
5	사료	불검출	13.46	불검출	불검출
6	사료	불검출	13.46	불검출	불검출
7	사료	불검출	불검출	불검출	불검출
8	사료	불검출	불검출	불검출	불검출
9	사료	불검출	불검출	불검출	불검출
10	사료	불검출	불검출	불검출	불검출
11	사료	불검출	불검출	불검출	불검출
12	사료	불검출	불검출	불검출	불검출
13	사료	불검출	불검출	불검출	불검출
14	사료	불검출	불검출	불검출	불검출
15	사료	불검출	불검출	불검출	불검출
16	사료	불검출	불검출	불검출	불검출
17	사료	불검출	불검출	불검출	불검출
18	사료	불검출	불검출	불검출	불검출
19	사료	불검출	불검출	불검출	불검출
20	사료	불검출	불검출	불검출	불검출
21	사료	불검출	34.48	불검출	불검출
22	사료	불검출	불검출	불검출	불검출
23	사료	불검출	불검출	불검출	불검출
24	사료	불검출	불검출	불검출	불검출
25	사료	불검출	불검출	불검출	불검출
26	사료	불검출	불검출	불검출	불검출
27	사료	불검출	불검출	불검출	불검출
28	사료	불검출	불검출	불검출	불검출
29	사료	불검출	불검출	불검출	불검출
30	사료	불검출	불검출	불검출	불검출
31	사료	불검출	불검출	불검출	불검출
32	사료	불검출	불검출	불검출	불검출
33	사료	불검출	불검출	불검출	불검출
34	사료	불검출	불검출	불검출	불검출
35	사료	불검출	불검출	불검출	불검출
36	사료	불검출	불검출	불검출	불검출
37	사료	불검출	불검출	불검출	불검출

나. ELISA를 이용한 견과류의 곰팡이독소 오염 조사

(1) 서론

- 곰팡이독소는 농작물의 생산, 수확 및 저장 등의 과정에서 발생되는 곰팡이의 2차 대사산물로, 지역, 온도 및 곰팡이 종류 등에 영향을 받는다. 식품에서 주로 발생되는 곰팡이독소는 *Aspergillus, Penicillium, Fusarium*속 균류에서 생성되며, 아플라톡신 B_1(Aflatoxin, AF), 오크라톡신 A(Ochratoxin A, OTA), 데옥시니발레놀(Deoxynivalenol, DON), 제랄레논(Zearalenone, ZEN), 니발레놀(Nivalenole, NIV), T-2 독소(T-2 toxin) 등이 대표적인 독소로 알려져 있다. 곰팡이 독소는 화학적으로나 구조적으로 그 형상이 매우 다양하다. 또한 2차 대사과정 후에 생성되는 합성물은 사람이나 가축 모두에게 급성 또는 만성적 독성 영향을 주게 된다. 특히 화학적으로 안정하여 열을 가하는 조리 가공 중에 잘 파괴되지 않고 최종식품에 남아 있어 유해한 영향을 끼친다.
- 최근 기후변화로 인한 폭염, 집중호우, 기온상승과 같은 환경변화로 인해 곰팡이의 성장이 증가할 수 있어 농산물과 이를 가공한 식품에서 곰팡이독소에 대한 노출가능성은 지속적으로 높아질 수 있다.
- 아플라톡신은 국제암연구소(IARC, International Agency for Research on Cancer)에서 Group 1에 속한 발암물질로 분류되어 있으며, 20여종의 독소가 있는 것으로 알려져 있는데 이중 아플라톡신 B1의 독성이 가장 크며 체내에서 간경변과 간암 등을 유발시킨다. 제랄레논, 데옥시니발레놀, 니발레놀, T-2 독소, 푸모니신은 *Fusarium* 속 곰팡이가 생산하는 독소로 푸모니신을 제외하곤 IARC에서 Group 3으로 분류하고 있는 물질이다. 특히 제랄레논은 옥수수 등의 곡류에서 오염되어 있으며, 가축에서 성 성숙전 증후군, 생식불능, 에스트로겐 활성을 나타내어 생식기능에 영향을 끼치는 것으로 보고되고 있다. 한편 발암가능성이 있는 Group 2B로 분류하고 있는 오크라톡신 A는 *Aspergillus ochraceus, Penicillium verrucosum* 등이 커피 및 포도 등에서 발견되며, 신장 세포에 독성을 일으킨다. 데옥시니발레놀에 의한 급성증상은 5~30분 이내에 나타나며, 메스꺼움, 구토, 복통, 설사, 현기증, 두통 등이다. 주로 밀, 옥수수, 보리, 귀리 등 곡류에서 발견되며, 어린이 이유식, 과자 등에서도 검출되며 가장 빈번하게 발생되는 독소로 알려져 있다. T-2 독소의 경우, 최초 표적기관은 면역체계이다. 골수형성저하증 및 무형성으로 인해 백혈구의 감소증이 두드러진 것으로 알려져 있다. *Fusarium* 속 곰팡이독소 중에서 가장 독성이 강한 것으로 알려져 있다.
- 곰팡이독소를 검출하기 위해서는 화학·생물학적으로 분석하는 Thin Layer Chromatography (TLC)법, High Performance Liquid Chromatography (HPLC)법 및 LC/MS/MS(Liquid Chromatography-Mass Spectrometry)등을 사용한다. 그러나 이러한 방법들은 복잡한 시료 추출과정과 분석과정이 요구되어 곰팡이독소의 정량까지 수일 이상의 시간이 소요된다. 위의 방법보다 간편하면서 다량의 시료를 동시에 수행하며 신뢰성을 가지고 있는 ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent assay) 방법을 적용하였다. 견과류에서 연구가 많이 된 아플라톡신과 견과류에 오염 연구 자료가 거의 없는 오크라톡신, 데옥시니발레놀, 제랄레논 그리고 T-2 독소 등을 대상으로 견과류에서의 오염수준 및 다독소 오염여부를 확인하고, 식품의 안전성을 평가하여 먹거리 선택에 유용한 정보를 제공하고자 한다.

(2) 실험재료와 방법

(가) 실험재료

○ 견과류에 오염되어 있는 곰팡이독소를 확인하기 위하여 서울, 인천, 경기, 충남, 충북 및 백화점, 대형할인마트, 재래시장에서 2018년부터 4월부터 7월까지 구입한 견과류 109종을 구입하였다. 모든 시료는 포장단위로 균질화하여 -20℃ 냉동 보관하면서 사용하였다.

(나) 시험방법

○ 곰팡이독소 중 아플라톡신, 오크라톡신 A, 데옥시니발레놀, 제랄레논, 그리고 T-2 독소 총 5종의 독소를 선정하여 검출하였다. 아플라톡신 표준품은 Mix kit 4 solution(Supelco, USA)을 사용하였고, 제랄레논, 오크라톡신 A, 데옥시니발레놀, T-2 독소는 Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)에서 구입한 것을 사용하였다. ELISA 시험을 위해 각 시료를 샘플 당 20 g씩 마쇄한 뒤 데옥시니발레놀은 물에 나머지 독소들은 75% 메탄올에 현탁하여 여과한 다음 여과액을 ELISA test 키트(MaxSignal® Aflatoxin Total, Ochratoxin, Deoxynivalenol, zearalenone, T-2 toxin Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA) Test Kit, (Bioo Scientific Corp., USA)를 사용하였고, 검출한계와 검출범위에 따라 AgraQuant® Aflatoxin, Ochratoxin A, Zearalenone, Deoxynivalenol, T-2 toxin(Romer, USA)제품도 사용하였다(Table 1). 450nm를 측정할 수 있는 Multiscan (Thermo Scientific Inc., USA)를 이용하여 독소량을 측정하였다

(다) 검량곡선의 직선성 및 검출한계

○ 시험용액을 이용하여 제조한 solution standard로 1~200 μg/kg의 범위에서 matrix matched calibration curve를 작성한 결과 양호한 직선성을 확인할 수 있었으며 결정계수(R^2)는 0.99이상으로 나타났다. 검출한계는 각 진단키트의 특성별로 결과를 확인할 수 있었다(Table 1.). 분석된 모든 결과들에 대해서는 SPSS 통계처리 프로그램 version 11을 사용하여 통계분석 하였다. 통계분석은 ANOVA 프로그램의 Tukey's test으로 $p<0.05$의 수준에서 통계학적 유의성을 검증하였다.

(3) 결과 및 고찰

(가) 곰팡이독소 검출량

○ 곰팡이독소(아플라톡신, 오크라톡신 A, 제랄레논, 데옥시니발레놀, T-2 독소)를 견과류 총 109건에 대하여 분석하였다. 먼저 아플라톡신의 검출결과를 살펴보면, 아몬드가 21건 중 4건(19.0%), 호두 16건 중 8건(50%), 땅콩 13건 중 3건(23.1%), 피스타치오 12건 중 3건(25%) 등에서 검출되었으며, 총 109건 중 31건(28.4%)에서 아플라톡신이 검출되었고, 평균 검출량은 3.92 μg/kg이었고, 검출범위는 0.8-14.2 μg/kg을 보였다(Table 2). 박 등의 연구에 따르면[9], 국내 유통 중인 견과류, 장류 등에서 총 아플라톡신이 0.01-3.96 μg/kg 수준으로 검출되었으며, 본 연구와 유사한 값을 보여주고 있다. 이는 농산물 재배 당시의 기상환경, 저장 및 유통 상태 등에 기인한 것으로 판단된다.

표 34. The incidence and the range of Aflatoxin in various nut products by ELISA

Items	Incidence		The range of total Aflatoxin (μg/kg)	Average (μg/kg)
	NO	%		
Almonds	4/21	19.0	1.0~1.8	1.5±0.2
Walnuts	8/16	50	2.2~6.3	4.3±1.2
Peanuts	3/13	23.1	0.8~3.5	2.5±0.9
Pistachio nuts	3/12	25.0	1.0~2.9	1.8±1.1
Cashew nuts	2/12	16.7	0.5~1.1	0.8±0.2
Pecans	1/7	14.3	6.0	6.0±0.1
Brazill nuts	3/10	30.0	4.6~14.2	8.6±2.8
Macadamia nuts	2/5	40.0	4.2~7.0	5.6±1.1
Pine nuts	2/5	40.0	3.0~4.6	3.8±0.4
Cacao nibs	2/4	50.0	3.0~3.8	3.4±0.3
Sacha Inchi	1/4	25.0	4.8	4.8±0.2
Total	31/109	28.4	0.8~14.2	3.92±2.5

NO : Sample number(Positive/analysed samples)
N.D. : Not detected
Average : In positive samples

○ 견과류의 아플라톡신 오염에 관하여 많은 연구가 있다. Diella 등은 이탈리아에서 견과류 124건 중 20건(16.1%)의 아플라톡신이 검출되었으며 평균값은 16.6 μg/kg, 그 범위는 8.8-387.3 μg/kg 였으며, 본 연구보다도 높은 검출치를 보였다. Chen 등의 연구에서는 대만에서 2012년 40개 중 6개(15%)가 아플라톡신이 검출되었으며, 2013년 16개 중 1개(6.2%)가 검출되었다. Essawet 등의 연구에 따르면, 리비아의 경우 아플라톡신이 검출된 견과류의 비율은 아몬드, 브라질 아몬드, 헤이즐넛, 캐슈, 호두 및 땅콩에 대해 각각 33.3, 40.0, 20.0, 13.3, 26.6 및 53.3 %였다. 또한 아플라톡신 B_1의 농도는 아몬드, 브라질 아몬드, 헤이즐넛, 캐슈, 호두 및 땅콩에 대해 각각 0.9-5.3, 1.4-4.8, 1.2-5.4, 2.1-3.4, 1.6-7.8 및 2.4-10.9 μg/kg 범위였다. 이란의 경우에도 분석된 피스타치오 샘플 10,068건 중 3,699건이 검출되었으며, 평균 5.9 μg/kg의 아플라톡신 B_1 오염을 보였다.

○ 오크라톡신 A의 경우, 피스타치오가 12건 중 7건(58.3%)이 검출되었으며, 마카다미아, 잣, 카카오닙스는 검출되지 않았다. 모두 109건 중 30건(27.5%)이 검출되었고, 견과류의 평균 검출량은 1.78 μg/kg, 범위는 0.2-4.9 μg/kg이었다(Table 3).

○ Essawet 등의 연구에 의하면, 리비아에서 아몬드, 브라질 아몬드, 헤이즐넛, 캐슈, 호두 및 땅콩의 오크라톡신 A는 각각 26.6, 33.3, 13.3, 20.0, 13.3 및 33.3%의 오염을 보였으며 농도는 브라질넛, 헤이즐넛, 캐슈, 호두 및 땅콩에 대해 각각 3.5-5.0, 1.5-2.2, 1.2-3.7, 1.3-2.5 및 4.0-6.5 μg/kg이 검출되었다. 이중 땅콩에서 6.5 μg/kg의 오크라톡신 A가 검출되어 최대 검출치였으며 이는 본 연구와도 비슷한 결과를 보였다.

표 35. The incidence and the range of Ochratoxin A in various nut products by ELISA

Items	Incidence		The range of ochratoxin A (μg/kg)	Average (μg/kg)
	NO	%		
Almonds	6/21	28.6	0.4~4.9	3.5±1.3
Walnuts	7/16	43.8	1.0~4.8	3.7±2.1
Peanuts	4/13	30.8	1.5~4.4	3.0±1.1
Pistachio nuts	7/12	58.3	0.2~1.9	1.1±0.3
Cashew nuts	2/12	16.7	1.0~3.5	2.3±0.8
Pecans	1/7	14.3	0.5	0.5±0.1
Brazill nuts	2/10	20	1.6~4.0	2.8±0.9
Macadamia nuts	0/5	-	N.D	0
Pine nuts	0/5	-	N.D	0
Cacao nibs	0/4	-	N.D	0
Sacha Inchi	1/4	25.0	2.6	2.6±0.1
Total	30/109	27.5	0.2~4.9	1.78±1.1

NO : Sample number(Positive/analysed samples)
N.D. : Not detected
Average : In positive samples

○ 제랄레논은 브라질넛 10건 중 5건(50%)이 검출되었고, 아몬드에서 21건 중 10건(47.6%) 검출되었고, 캐슈넛은 12건 모두 검출되지 않았다. 전체 109건 중 36건(33%) 검출되었고 평균 검출량은 19.1 μg/kg 이었고 0.1-124.4 μg/kg이 검출되었다. 이중 가장 많이 검출된 것은 카카오닙스로 124.0 μg/kg 검출되었다(Table 4).

○ 데옥시니발레놀 경우, 땅콩이 13건 중 5건(38.5%) 검출되어 가장 높게 나타났으며, 피스타치오 및 캐슈넛은 각각 12건을 확인한 결과 모두 검출되지 않았다. 109건 중 22건(20.2%)이 검출되었으며, 가장 높게 검출된 것은 호두로 140 μg/kg 검출되었다. 검출범위는 2.0-140.0 μg/kg이었고, 평균 검출량은 26.2 μg/kg이었다(Table 5).

○ Chunha 등의 연구에 의하면, 아몬드 14건 중 5건(36%)이 검출되었고 평균 검출값은 2.85 μg/kg, 캐슈넛은 3종 모두 100% 검출되었으며 평균값은 135.8 μg/kg, 헤이즐넛은 7건 중 6건(86%), 평균값은 56.01 μg/kg이었다. 전체 37개 중 15건(40.5%)이 검출되었고, 본 연구와는 상이한 결과를 나타냈다.

표 36. The incidence and the range of Zearalenone in various nut products by ELISA

Items	Incidence		The range of zearalenone (μg/kg)	Average (μg/kg)
	NO	%		
Almonds	10/21	47.6	1.0~56.0	15.8±5.4
Walnuts	7/16	43.8	11.6~37.0	18.2±9.1
Peanuts	2/13	15.4	16.7~21.0	18.8±2.1
Pistachio nuts	4/12	33.3	4.1~13.1	8.4±3.1
Cashew nuts	0/12	-	N.D.	0
Pecans	3/7	42.9	0.1~1.9	0.8±0.2

Brazill nuts	5/10	50.0	0.6~1.7	1.2±0.3
Macadamia nuts	2/5	40.0	0.4~13.4	6.9±3.6
Pine nuts	1/5	20.0	5.6	5.6±0.1
Cacao nibs	1/4	25.0	124.0	124.0±5.0
Sacha Inchi	1/4	25.0	10	10±1.0
Total	36/109	33.0	0.1~124.4	19.1±9.2

NO : Sample number(Positive/analysed samples)
N.D. : Not detected
Average : In positive samples

표 37. The incidence and the range of Deoxynivalenol in various nut products by ELISA

Items	Incidence		The range of deoxynivalenol (μg/kg)	Average (μg/kg)
	NO	%		
Almonds	4/21	19.0	25.6~105.0	57.8±21.0
Walnuts	6/16	37.5	20.6~140.0	72.3±18.4
Peanuts	5/13	38.5	15.0~105.0	59.4±25.6
Pistachio nuts	0/12	-	N.D.	0
Cashew nuts	0/12	-	N.D.	0
Pecans	2/7	28.6	68.6~57.9	63.2±3.4
Brazill nuts	1/10	10.0	2.0	2.0±0.1
Macadamia nuts	1/5	20.0	4.8	4.8±0.1
Pine nuts	1/5	20.0	18.5	18.5±0.1
Cacao nibs	1/4	25.0	5.0	5.0±0.1
Sacha Inchi	1/4	25.0	5.6	5.6±0.1
Total	22/109	20.2	2.0~140.0	26.2±18.1

NO : Sample number(Positive/analysed samples)
N.D. : Not detected
Average : In positive samples

○ T-2 독소의 검출량을 확인해 보면, 호두가 16건 중 8건으로 50% 검출된 것이 가장 높으며, 마카다미아, 잣, 카카오닙스, 사차인치는 모두 검출되지 않았다. 아몬드의 경우에는 21건 중 3건이 검출되어 14.3%에 불과하나, 검출된 평균량은 115.7 μg/kg으로 가장 높게 검출되었다. 모두 109건 중 22건이 검출되어 20.2%였으며, 검출범위는 11.2-151.0 μg/kg 이고, 평균 검출량은 55.91 μg/kg 이었다(Table 6). Chunha 등의 연구에서는 전체 37건 중 1건(2.7%)으로 땅콩에서 9.39 μg/kg 검출되어 본 연구와는 상이한 결과를 보였다.

○ 국내의 경우 식품의약품안전처 용역사업에서 곡류 등의 농산물 총 315점 시료를 수집하여 T-2와 HT-2 독소를 분석한 결과, T-2 독소의 검출율은 91%였으나 평균 오염량은 33.4 μg/kg으로 비교적 낮은 수준으로 견과류만 적용한 본 연구와 상이함을 보였다.

○ T-2 독소의 기준은 약 10여 개국에서 곡류에 한하여 불검출-100 μg/kg 범위로 설정되어 있으나, EU는 Commission Regulation (EC) No 1881/2006에 의해 식품 중 곰팡이독소에 관한 최대 기준을 정하고 있는데, T-2와 HT-2 독소 의 기준은 아직 없다. 현재 EU는 기준치 설정을 위해 오염도 자료나 분석법에 관해 검토하고 있는 중에 있으며, 현재 한국도 이들 독소의 기준이 없다. 지금 현재까지 T-2 독소에 따른 문제가 제기된 적은 없으나

우리나라도 위해 평가를 통한 기준을 설정할 필요가 있어 보인다.

표 38. The incidence and the range of T-2 toxin in various nut products by ELISA

Items	Incidence		The range of T-2 toxin (μg/kg)	Average (μg/kg)
	NO	%		
Almonds	3/21	14.3	11.2~192.0	115.7±14.1
Walnuts	8/16	50.0	21.0~124.0	62.3±15.1
Peanuts	4/13	30.8	30.0~121.0	62.8±18.1
Pistachio nuts	3/12	25.0	15.0~143.9	97.2±21.5
Cashew nuts	1/12	8.3	21.0	21.0±1.1
Pecans	1/7	14.3	172.0	172.0±4.1
Brazill nuts	2/10	20.0	17.0~151.0	84.0±15.6
Macadamia nuts	0/5	-	N.D.	0
Pine nuts	0/5	-	N.D.	0
Cacao nibs	0/4	-	N.D.	0
Sacha Inchi	0/4	-	N.D.	0
Total	22/109	20.2	11.2~151.0	55.91±19.5

NO : Sample number(Positive/analysed samples)
N.D. : Not detected
Average : In positive samples

(나) 다중곰팡이독소 검출현황

○ 곰팡이독소가 1종 이상 검출된 견과류는 109건 중 76건(69.7%)였으며, 곰팡이독소 1종이 검출된 시료는 33건(30.3%), 2종은 24.8%(27건), 3종은 12.8%(4건) 그리고 4종이 검출된 시료는 1.8%인 2건이었다. 특히 곰팡이독소 4종(오크라톡신, 제랄레논, 데옥시니발레놀 및 T-2)이 검출된 것은 2건으로 모두 호두에서 나타났다. 최근의 연구결과에 따르면[18,19], 3종의 곰팡이독소(데옥시니발레놀 + 아플라톡신 G2 + 푸모니신)가 검출된 4건의 헤이즐넛 시료였으며, 헤이즐넛 4건 및 캐슈넛 3건에서는 두 종의 곰팡이독소(데옥시니발레놀 + 아플라톡신 G_2)가 검출된 것으로 보고되었다.

○ Chunha 등의 연구에 의하면, 견과류 37건 중 28건(76%)이 하나 이상의 곰팡이독소에 오염되어 있는 것으로 나타났으며, 가장 높게 검출된 곰팡이독소는 데옥시니발레놀으로 캐슈넛에서 336.5μg/kg이 검출된 경우가 있었다.

○ 견과류 109건 중 76건(69.7%)에서 곰팡이독소가 검출되었으며, 아몬드 21건 중 16건(76.2%), 호두 16건 중 15건(93.8%), 땅콩 13건 중 9건(69.2%), 피스타치오 12건 중 9건(75.0%), 캐슈넛 12건 중 9건(75.0%), 피칸 7건 중 5건(71.4%), 브라질넛 10건 중 5건(50.0%), 마카다미아 5건 중 5건(100.0%), 잣 5건 중 4건(80.0%), 카카오닙스 4건 중 2건(50.0%), 사차인치 4건 중 2건(50.0%)에서 검출되었다. 마카다미아 > 호두 > 아몬드 > 피스타치오, 캐슈넛 등의 순으로 오염율이 높은 것으로 나타났다.

○ 견과류에 관한 현재의 식품 기준 및 규격은 아플라톡신만이 기준이 있으며, 견과류 및 곡류, 두류 등에 15.0 μg/kg (B_1은 10.0μg/kg)이다. 오크라톡신은 곡류 등에 한하여 5.0 μg/kg, 데옥시니발레놀은 곡류 등에 한하여 1.0 mg/kg이며, 제랄레논은 곡류 등에 200 μ

g/kg의 기준을 가지고 있으며, T-2 독소의 기준은 없다.

○ 본 연구 결과를 현재 식품 기준 및 규격에 비추어 볼 때 아플라톡신(15μg/kg)에만 적용될 수 있으며, 모든 견과류에서 기준이하로 검출되어 문제가 없다고 할 수 있다. 오크라톡신, 데옥시니발레놀, 제랄레논, T-2 독소의 기준은 없으며, 곡류 등의 기준으로 적용한다고 하더라도 기준치 이하로 문제가 될 것은 없다. 하지만, 견과류가 소비자에게 많이 섭취되고 있으므로, 향후 그 소비는 더욱 증가할 것이므로 이에 대한 규격 설정과 함께 안전관리를 추진해야 할 것으로 사료된다.

(다) 요약

○ 시중 유통 중인 견과류 109건에 대하여 5종의 곰팡이독소(아플라톡신, 오크라톡신 A, 데옥시니발레놀, 제랄레논, T-2 독소)를 ELISA 진단 키트를 이용하여 분석하였다. 아플라톡신의 검출결과를 살펴보면, 총 109건 중 31건(28.4%)에서 검출되었고, 평균 검출양은 3.92 μg/kg이었고, 범위는 0.8-14.2 μg/kg의 검출량을 보였다. 오크라톡신 A의 경우, 109건 중 30건(27.5%)이 검출되었고, 검출된 견과류의 평균 검출량은 1.78 μg/kg, 범위는 0.2-4.9 μg/kg의 검출량을 보였다. 제랄레논은 109건 중 36건(33%)이 검출되었고 평균 검출량은 19.1 μg/kg 이었고 0.1-124.4 μg/kg이 검출되었다. 이중 가장 많이 검출된 것은 카카오닙스로 124.0 μg/kg이 검출되었다. 데옥시니발레놀 경우, 109건 중 22건(20.2%)이 검출되었고, 검출범위는 2.0-140.0 μg/kg, 평균 검출량은 26.2 μg/kg이었다. T-2 독소는 109건 중 22건이 검출되었으며, 검출범위는 11.2-151.0 μg/kg이고, 평균 검출량은 55.91 μg/kg로 나타났다.

○ 곰팡이독소가 1종 이상 검출된 견과류는 109건 중 76건(69.7%)였으며, 곰팡이독소 1종이 검출된 시료는 33건(30.3%), 2종은 24.8%(27건), 3종은 12.8%(4건) 그리고 4종이 검출된 시료는 1.8%인 2건이었다. 특히 곰팡이독소 4종(오크라톡신, 제랄레논, 데옥시니발레놀 및 T-2)이 검출된 것은 2건으로 호두에서 나타났다.

○ 모니터링 결과 아플라톡신의 경우, 국내 기준이하의 안전한 수준으로 검출되었으나 오크라톡신, 데옥시니발레놀, 제랄레논, T-2 독소 등의 곰팡이독소에 대한 기준이 없으므로 이에 대한 기준마련이 필요할 것으로 사료되며, 곰팡이독소의 동시 오염에 대한 연구와 더불어, 지속적이고 광범위한 오염실태조사가 이루어져야 할 것으로 판단된다.

다. Mycotoxigenic fungi 동정

○ LC 및 LC-MS/MS를 이용하여 mycotoxin의 정성 및 정량을 확인하였으며, 이의 시료에는 mycotoxin 생성 곰팡이가 오염되어 있을 가능성이 높기 때문에 이를 확인하기 위하여 각 시료에 오염된 mycotoxigenic fungi를 배양하고 이를 분리한 다음 동정시험을 추진하였다. 먼저 VITEK-MS 방법을 사용한 다음 확인하였고, 이를 통해서 확인이 되지 않은 경우 ITS(Internal transcribed spacer) 염기서열 분석을 이용한 진균을 동정하였다.

○ LC 및 LC-MS/MS를 이용하여 Mycotoxin이 검출된 건과류 3종, 생식 및 선식 13종, 어분 2종, 커피 2종, 동물사료 7종 등 총 27종을 대상으로 곰팡이 동정을 실시하였다.

○ 식품공전의 진균시험 방법을 이용하여 10g씩 멸균생리식염수로 1/10로 희석한 다음 PDA (Potato Dextrose Agar), SDA(Sabroad Dextrose agar)배지에 도말하였다[식품위생법(식품 등의 기준 및 규격, 식품의약품안전처 고시 2016-72호(2016. 7. 26)].

○ 25℃ 항온기에서 5일간 배양한 후 예상되는 균을 PDA, SDA, Rose bengal agar(RBA)에 시료를 바르고 멸균된 spreader, 면봉으로 도말하였다. 또는 0.85% 생리식염수로 1/10로 희석시킨 다음 1mL을 PDA, SDA, RBA 배지에 도말시킨 후 25℃에 7일에서 10일간 배양하였다.

(1) MALDI-TOF MS (VITEK MS)를 이용한 분석

(가) MALDI-TOF MS 분석의 원리

○ MALDI-TOF MS (Matrix-Ass isted Laser Desorption/Ionization Time-of Flight Mass Spectrometry)는 1980년대에 단백질, DNA등과 같은 생체고분자 물질의 분석을 위하여 개발되었다. MALDI 프로세스에서는 생체 고분자의 열적, 화학적 분해 없이 분자 구조를 유지하면서 원래의 고체 상태로부터 그대로 기체 상태의 이온화가 이루어진다. 휘발성이 적거나 잘 녹지 않은 시료의 분석이 가능하며 컬럼을 사용하지 않으므로 기체/액체크로마토그래피 질량분석에 비해 상대적으로 다루기가 쉽고 이온화 과정에서 분자구조가 깨지지 않아 측정되는 분석물질의 분자량 정보를 제공한다.

○ 단백질과 펩타이드 분석을 중심으로 생명분야 연구를 주도하고, 프로테오믹스(Proteomics)라는 신학문을 탄생시킨 MALDI-TOF MS는 합성고분자 분석, 항원-항체 반응, DNA-DNA hybridization, 탄수화물 분석, 지질 분석, 미생물 분석 등 다방면에 활용되고 있다.

○ MALDI-TOF 질량분석법은 크게 세 단계로 이루어진다. 분석물질이 이온화할 수 있도록 시료에 매트릭스라는 저분자의 유기화합물을 혼합하여 고체상태의 결정을 형성시킨다. 여기에 짧은 주기의 강한 펄스 레이저를 조사하여 결정화된 시료-매트릭스 혼합물로부터 이온을 방출시킨다. 조사된 레이저 에너지는 결정화된 매트릭스를 통해 시료를 이온화시키기 때문에 매트릭스의 선정 및 시료와 매트릭스의 비율 등의 최적화가 실험결과에 매우 중요한 영향을 미친다.

○ 단백질 분석에는 2,5-dihydroxybenzoic acid(DHB), a-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA), 또는 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid (sinapinic acid, SA)등의 매트릭스가 주로 사용된다. 형성된 이온은 electric field에서 같은 에너지를 받고 가속화 되고 field free 지역에서 가벼운 이온은 먼저, 무거운 이온은 나중에 검출되는 원리(time of fight, TOF)에 의해 이온의 비행시간을 측정하여 분석물질의 질량을 분석한다.

(나) MALDI-TOF 질량분석기반 미생물 동정

○ MALDI-TOF 질량분석기반 미생물 동정법은 미생물시료를 직접 또는 추출하여 얻은 단백질의 패턴을 측정하고 미생물 고유의 단백질 패턴 데이터베이스와 비교분석하여 미생물을 동정하는 방법이다. 미생물 동정에 사용되는 대부분의 바이오마커는 세포 단백질의 20% 이상을 차지하는 ribosomal 단백질이다.

○ Ribosomal 단백질은 영양분 부족이나 저온 스트레스 조건에서 변화되기 때문에 질량분석을 이용한 미생물동정의 오인을 피하기 위해서는 저온 보관에 노출되지 않은 fresh한 시료를 사용하거나 즉시 질량 분석을 하지 못하는 경우에는 70% 에탄올에 보관해야 한다.

○ 미생물 동정을 위한 MALDI-TOF 질량 분석 과정은 시료 준비, MALDI-TOF 스펙트라 획득, 데이터 분석의 3단계로 이루어진다(그림 참조). 시료 준비과정은

MALDI-TOF 질량분석의 재현성 있는 결과를 얻는데 매우 중요한 부분이다. 배양된 미생물 콜로니를 MALDI 시료 플레이트에 도말하여 실온 건조한 후 그 위에 매트릭스를 도포하여 실온 건조시켜 균일한 크리스탈을 형성시킨다.

- 매트릭스 용액은 아세토니트릴, 메탄올과 같은 유기용매에 trifluoroacetic acid, formic acid 등과 같은 강한 유기산을 첨가물로 사용하여 제조하는데, 강한 유기산은 MALDI TOF 분석에서 protonation 이온화를 도와주어 감도를 높이는 역할을 한다. 또한 미생물 콜로니를 직접 분석할 경우에는 박테리아 셀의 파괴를 높여 미생물의 단백질이 잘 추출되게 하므로, 시료를 도말 한 후 매트릭스를 도포하기 전에 강한 유기산을 처리하는 것이 미생물 동정을 위한 재현성 있는 단백질 패턴을 얻는데 도움이 된다.
- MALDI-TOF 질량 분석은 2 ~ 20 kDa 범위에서 스펙트라를 얻는다. 박테리아의 지놈에 의해서 코딩되는 주요 단백질이 4 ~ 15 kDa이고, Swissprot에 등록되어 있는 원핵생물의 단백질 분포가 15 kDa이하에서 가장 많을 뿐 아니라 보고된 문헌에 의하면 intact 박테리아 셀에서 검출된 바이오마커의 대부분이 15 kDa이하이기 때문에 미생물 동정 데이터베이스는 2 ~ 20 kDa 범위에서 구축되어 있다.
- MALDI-TOF를 이용한 질량의 mass를 스펙트라로 확인한 것을 컴퓨터에 저장된 표준균주의 스펙트라와 비교하여 균주를 확인하게 된다.

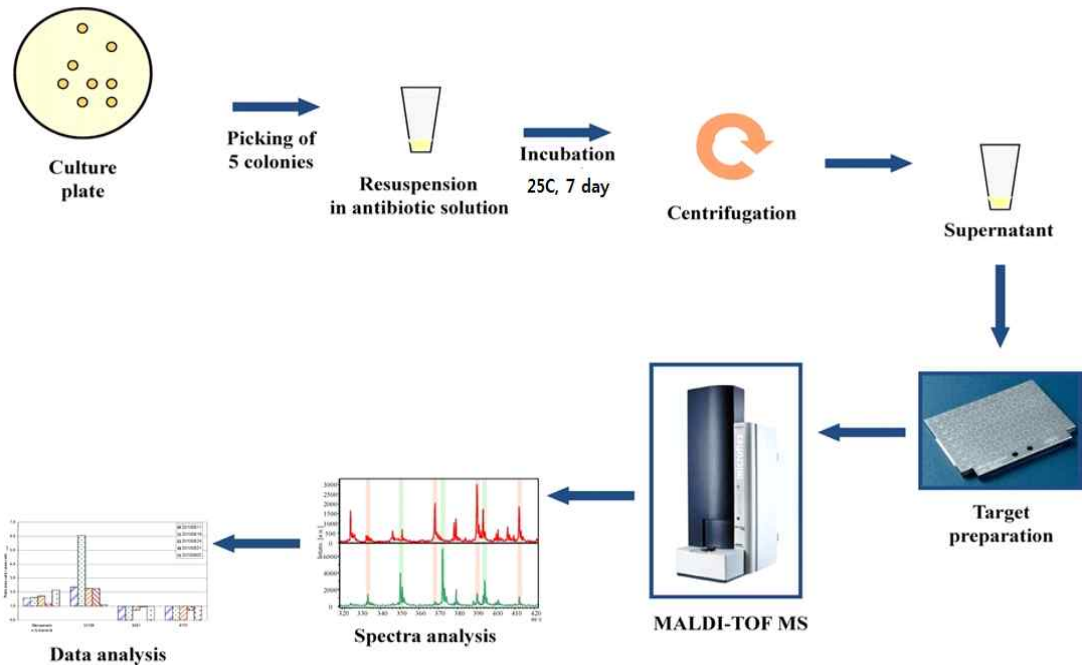


그림 79. 미생물 동정 절차

(2) ITS(Internal transcribed spacer) 염기서열 분석 이용한 진균 동정

- 세균 및 진균을 동정하기 위하여 염기서열방법을 이용하고 있다. 세균의 경우에는 16S

rRNA를 이용하는데 세균의 종간 보존 염기서열과 종 특이 염기서열을 함께 지니고 있어서 세균 분류 및 동정에 널리 이용되고 있다. 진균의 경우에는 ITS(Internal transcribed spacer) 염기서열 분석을 사용하였다. 본 시험을 신뢰성 있는 VITEK MS 방법의 결과가 unknown으로 나온 결과를 중심으로 확인하였다.

(가) 시험 방법

○ Genomic DNA 추출

- DNA 분리. Fungal DNA를 분리하기 위하여 Liu 등의 실험방법을 변형시켜 적용하였다. 1.5ml eppendorf tube에 500㎕ lysis buffer (400mM tris-HCI [pH 8.0]+60 mM EDTA [pH 8.0], 150 mM NaCI+1% Sodium dodecyl sulfate)에 소량의 mecelia를 넣은 후 상온에서 10분간 방치 하고 pH 4.8로 교정하여 150㎕ potassium acetate를 넣었다. 그러고 나서 10,000 xg로 1분간 원심분리하여 상층액을 다른 eppendorf tube에 넣은 후 다시 원심분리하였다. 그리고 원심분리된 상층액을 eppendorf tube에 넣고 동량의 isopropyl alcohol를 넣은 후 뒤집어서 흔든 후 10,000 xg으로 2분간 원심분리하여 상층액을 버렸다. DNA pellet을 300㎕의 70% ethanol로 세척한 후 10,000 RPM으로 5분간 원심분리하여 상층액을 버리고 DNA pellet을 진공펌프로 건조시켰다. 그리고 50㎕의 3차 증류수에 용해시켰다.

○ Genomic DNA 상층액 10μL를 DNA template로 사용하여 중합효소연쇄반응을 시행하였다. 한쌍의 primer(5'- TCC GTA GGT GAA CCT GCGG-3' 및 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')를 사용하여 Mastercycler gradient (ABI, US)로 16S rRNA 유전자를 증폭시켰다.

○ 증폭조건은 94℃에서 5분간 열 변성 후 94℃ 30초, 55℃ 1분, 72℃ 1분의 과정을 35회 반복 후 72℃에서 5분간 연장반응을 실시하였다.

○ 증폭된 DNA는 전기영동을 통해 band를 확인한 후 Quick spin DNA fragment Extraction kit (Biointron, Korea)를 이용하여 증폭산물을 정제하였다. 정제된 DNA는 ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)를 사용하여 양방향으로 염기서열을 분석하였다.

○ 염기서열 상동성 분석을 통한 세균 및 진균 동정

- ITS 유전자의 염기서열 실험 결과 데이터를 확인하기 위하여 GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) 또는 EMBL (http://www.ebi.ac.uk/ embl/)의 자료와 비교하였다. 세균의 종 및 속 동정을 위한 기준은 자료분석의 일관성을 위하여 CLSI의 기준 대신 연구 시작부터 적용하였던 기준을 사용하였다. 98% 이상 일치율을 보일 경우 특정 종으로, 95% 이상 일치율을 보일 경우 특정 속으로 동정하였다.

(3) 곰팡이 동정 결과

○ 견과류 3종, 생식 및 선식 13종, 어분 2종, 커피 2종, 동물사료 7종 등 총 27종을 대상으로 곰팡이 동정하였다. VITEK-MS로 확인한 17종이었고 염기서열로 확인한 것은 5종이었다. 또한 두 가지 방법 모두로도 확인하지 못한 것은 4종이었고 곰팡이가 배양되지 않아 알 수 없는 것은 1종이었다.

. ○ 견과류 3종은 모두 아플라톡신만이 확인되었고 이의 곰팡이는 *A. flavus*로 확인되었다. 생식 및 선식은 모두 12종 제랄레논이 검출되었으며, *F. graminearum이 5종가 검출되었고*

Aspergillus spp 1종, Fusarium spp.2종, 검출되지 않은 것이 1종, 두가지 방법 모두 실험해서 알 수 없는 것이 3종 이었다.

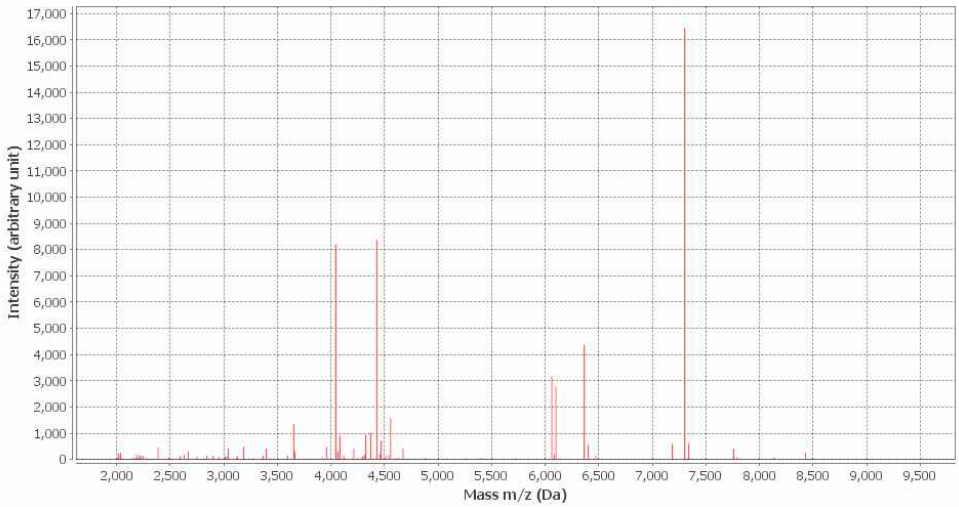
○ 어분과 커피원두는 각각 2종을 모두 *A. flavus*로 확인되었다. 또한 애견사료에서는 6종의 *A. ochraceus*를 확인하였고, 1종은 확인할 수 없었다. 표 1 참조]

○ 곡류에서는 *A. terreus, F. verticillioides, A. ochraceus, A. niger, F. verticillioides, A. ochraceus, A. flavus, F. verticillioides, A. ochraceus, F. graminearum, A. flavus*등 검출되었다. 특히 *A. flavus*은 *aflatoxin* 검출에 나타났으며, *F. verticillioide*은 푸모니신 및 Trichothecene (Deoxynivalenone, Nivalenone)등에, *A. ochraceus*은 *Ochratoxin* 검출에, *F. graminearum*은 Trichothecene (Deoxynivalenone, Nivalenone)등에서 검출된 것으로 나타나 mycotoxigenenic 균주가 검출된 곳에 곰팡이 독소유전자도 같이 검출된 것을 확인하였다. (표 참조)

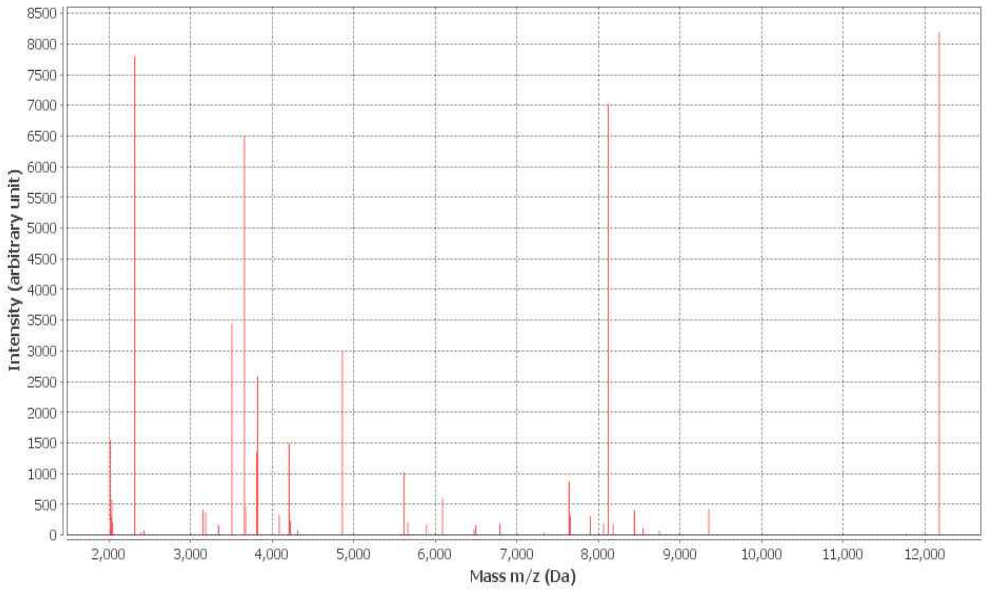
표 39. 진균 동정 확인 결과

순번	제품명	총아플라톡신 (μg/kg)	오크라톡신A (μg/kg)	제랄레논 (μg/kg)	진균 확인
건과류	구운아몬드	**(아플라톡신B1) 8.77**	불검출	불검출	*A. flavus*
	로스티트 피너츠	(아플라톡신 B1) 15.27 (아플라톡신 B2) 1.18	불검출	불검출	*A. flavus*
	맛사랑로스티드피넛	검출 (83 μg/kg)	불검출	불검출	*A. flavus*
생식 및 선식	해피굿모닝생식	불검출	불검출	검출 (28.12)	Fusarium spp.
	강창환발아생식	불검출	불검출	검출 (54.39)	*F. graminearum*주1)
	아침을여는편해식생식	불검출	불검출	검출 (83.08)	Fusarium spp.
	예찬생식	불검출	불검출	검출 (33.92)	*Aspergillus* spp.
	스프라우트생식	불검출	불검출	검출 (20.85)	*F. graminearum*
	즉석섭취 제조선식	불검출	불검출	검출 (33.02)	불검출
	즉석섭취 제조선식	불검출	불검출	검출 (33.35)	*F. graminearum*
	즉석섭취 제조선식	불검출	불검출	검출 (24.57)	unknown
	즉석섭취 제조선식	불검출	불검출	검출 (85.21)	unknown
	통곡물선식	불검출	불검출	검출 (49.96)	Fusarium spp.
	더힘찬 선식	불검출	불검출	검출 (60.56)	unknown
	블랙생선식	불검출	불검출	검출 (82.40)	*F. graminearum*주1)
	아침든든선식	불검출	불검출	검출 (41.77)	*F. graminearum*
어분	한강 어분	10.1	불검출	불검출	*A. flavus*
	희나리 119	13.2	불검출	불검출	*A. flavus*
커피원두	커피 원두 1	5.1	불검출	불검출	*A. flavus*주1)
	커피 원두 10	6.3	불검출	불검출	*A. flavus*
동물사료	ANF 치킨 앤 라이스어덜트	불검출	40.59	불검출	A. ochraceus
	K9 내츄럴	불검출	24.39	불검출	A. ochraceus
	LID 감자&오리고기 포뮬라	불검출	20.45	불검출	A. ochraceus
	고 센서티비티	불검출	16.00	불검출	unknown
	뉴트로 내추럴 초이스	불검출	13.46	불검출	A. ochraceus주1)
	로얄캐닌 미니 스타터	불검출	13.46	불검출	A. ochraceus
	8in1 Excel 마늘	불검출	34.48	불검출	A. ochraceus주1)
곡류	보리, 쌀 등	불검출	불검출	불검출	*F. verticillioides* *A. ochraceus* *A. niger* *F. verticillioides* *A. fumigatus* *A. ochraceus* *A. flavus* *F. verticillioides* *A. ochraceus* *F. graminearum*

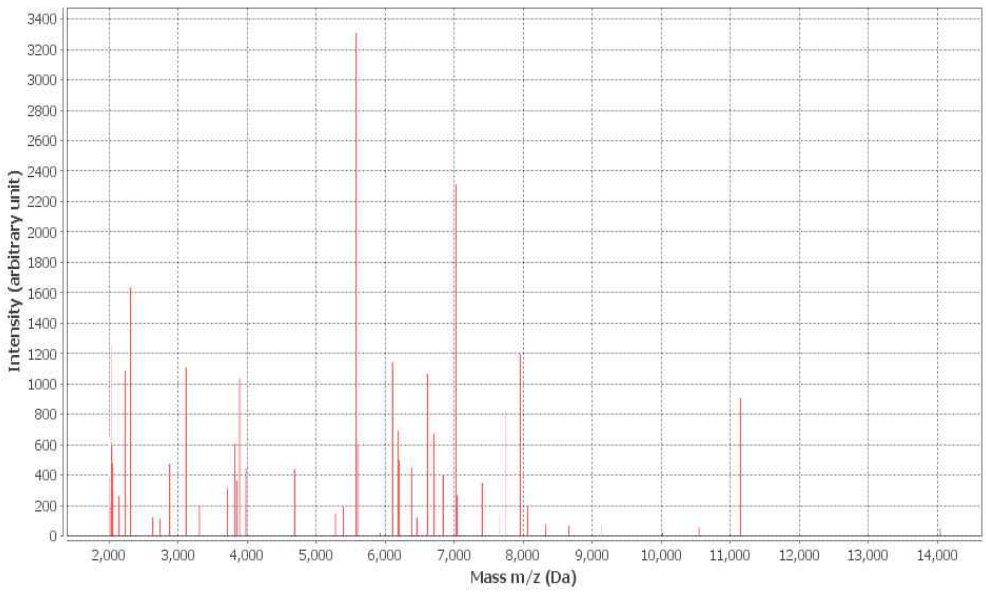
주1) ITS- 염기서열 확인



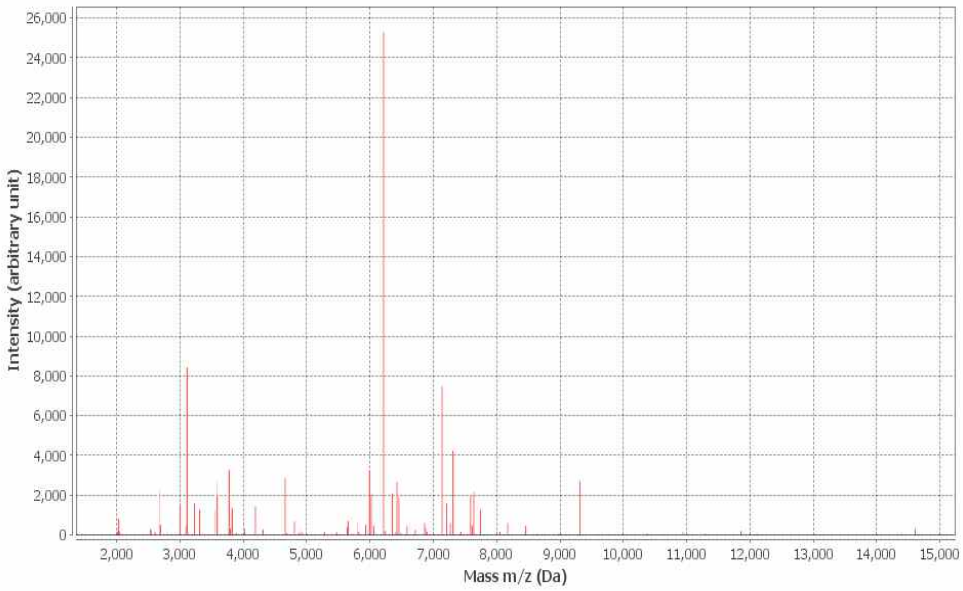
Aspergillus flavus wild type-1



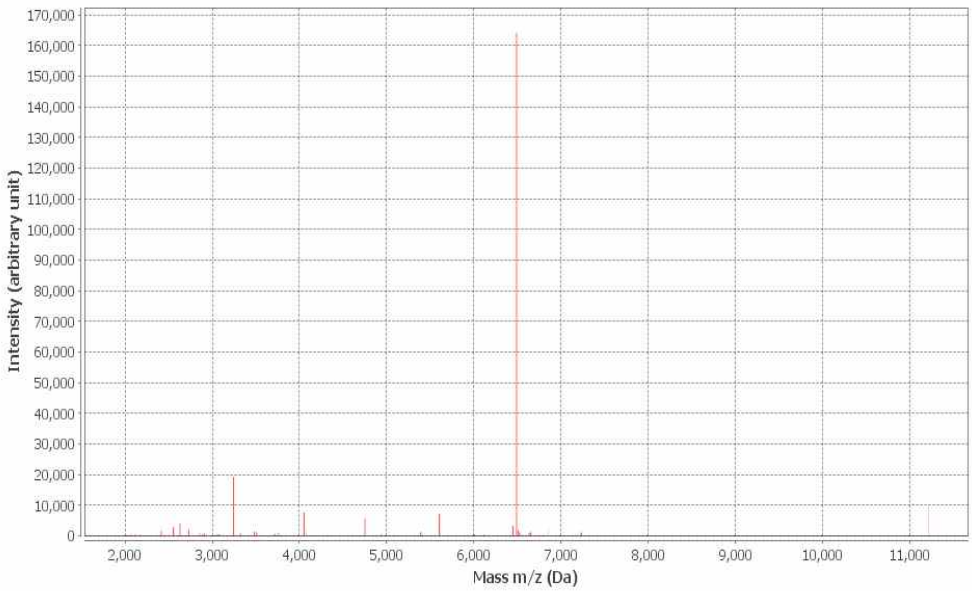
Fusarium graminerium wild type



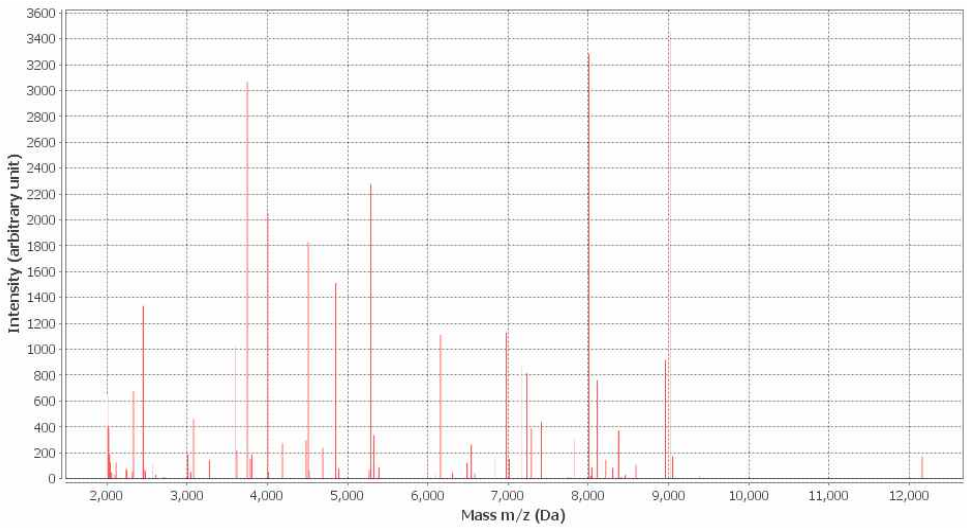
Aspergillus ochraceus wild type-1



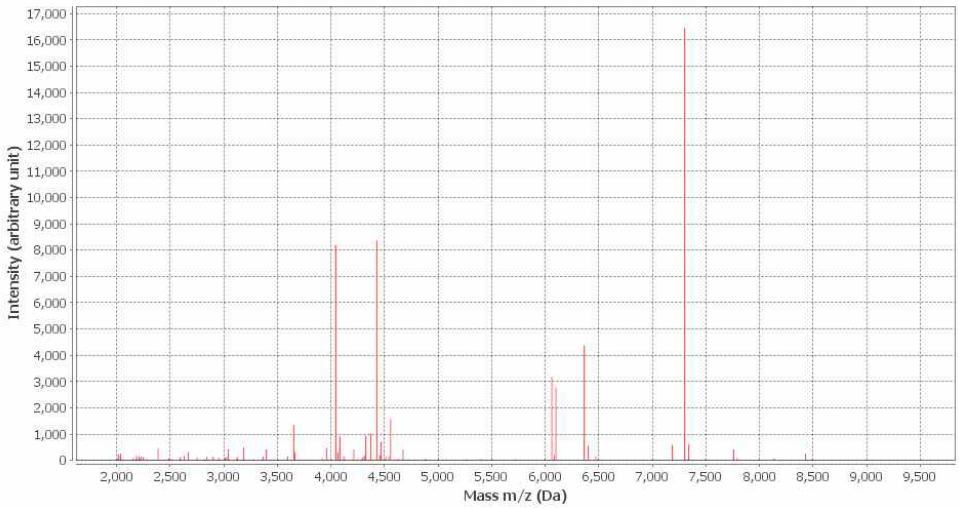
Aspergillus niger wild type



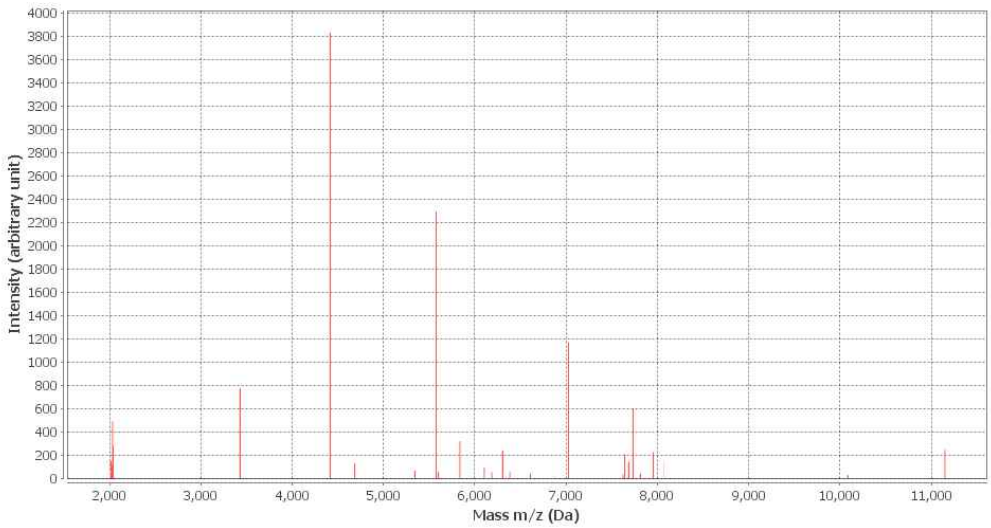
Fusarium verticillioides wild type-1



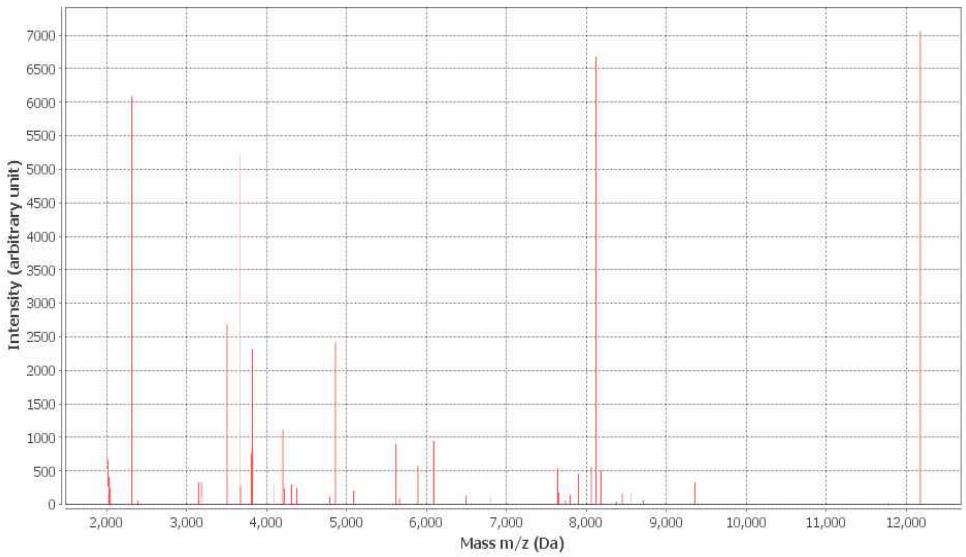
Aspergillus flavus wild type-2



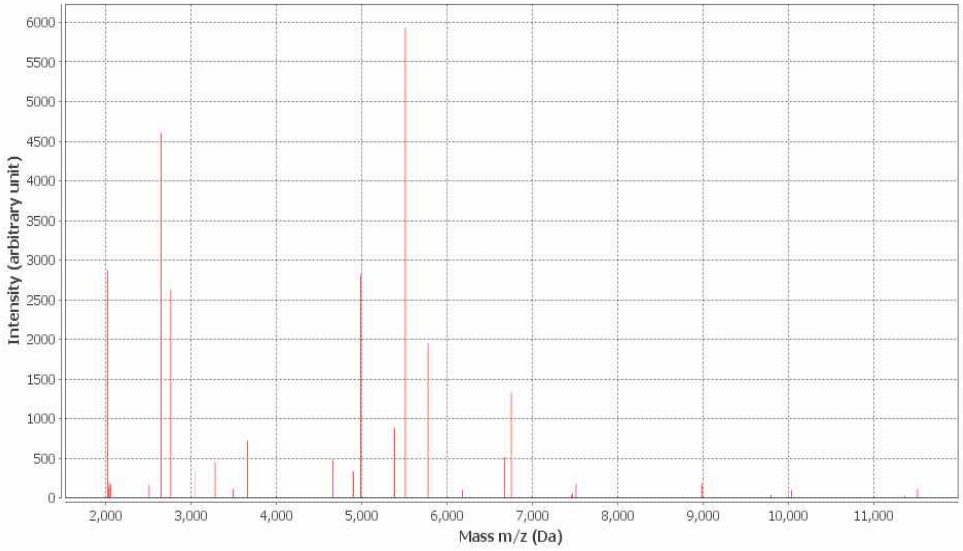
Aspergillus ochraceus wild type-2



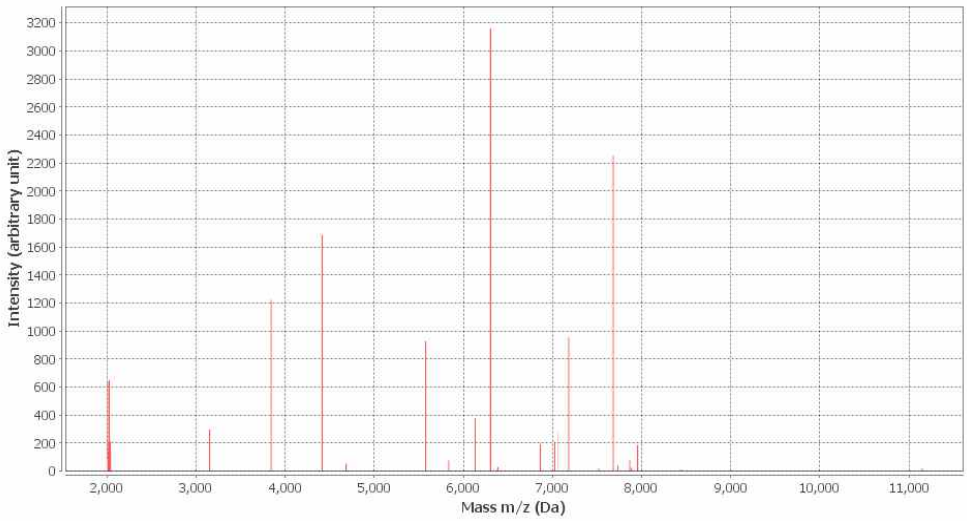
Aspergillus ochraceus wild type-3



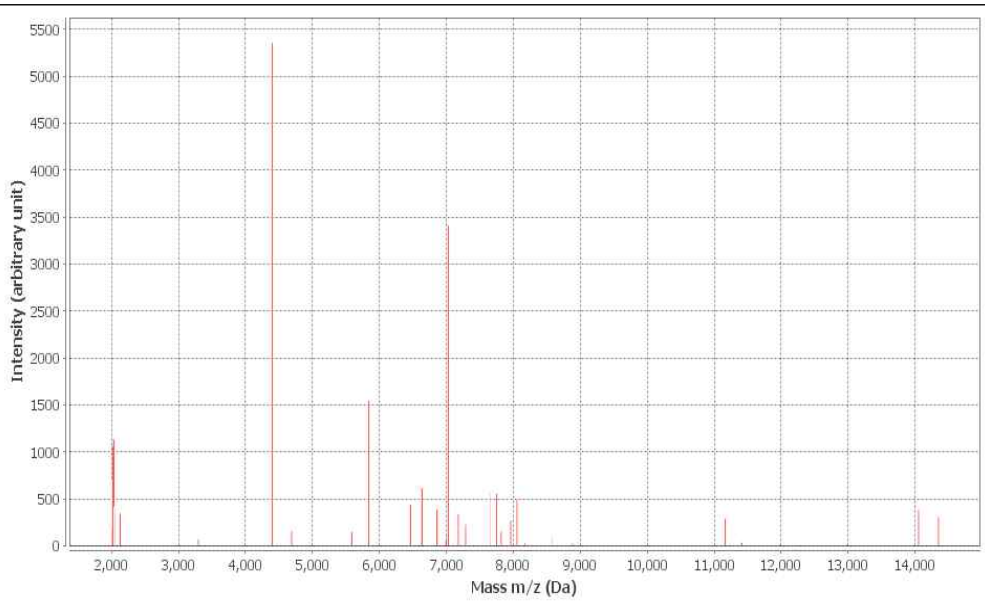
Aspergillus fumigatus wild type



Aspergillus terreus wild type



Fusarium verticillioides wild type-2



Fusarium verticillioides wild type-3

그림 82. VITEK MS 시험결과

(4) Real time PCR을 이용한 mycotoxigenic fungus 확인

○ mycotoxigenic fungus를 real time PCR로 확인

- PDA, SDA, RBA 배지에 도말시킨 후 25℃에 7일에서 10일간 배양시킨다음 VITEK MS로 동정한 균주에 대하여 genomic DNA를 Liu 등의 실험방법 및 전자동 장비인 eMEG (비오메리으사, 프랑스) 장비를 이용하여 DNA를 추출한 다음 위에서 제시한 방법으로 real time PCR을 시행하였다.

○ Real time PCR을 이용한 균주 동정 결과

- Aflatoxin (Nor1)은 모두 2종의 곡물에서 검출되었으며, Fumonisin은 3종, Trichothecene (Deoxynivalenone, Nivalenone)은 2종, ochratoxin A은 3종의 곡물에서 검출되었다. 또한 20여종의 축산물을 대상으로 곰팡이 독소 생성 곰팡이를 확인한

결과 모두 검출되지는 않았다.

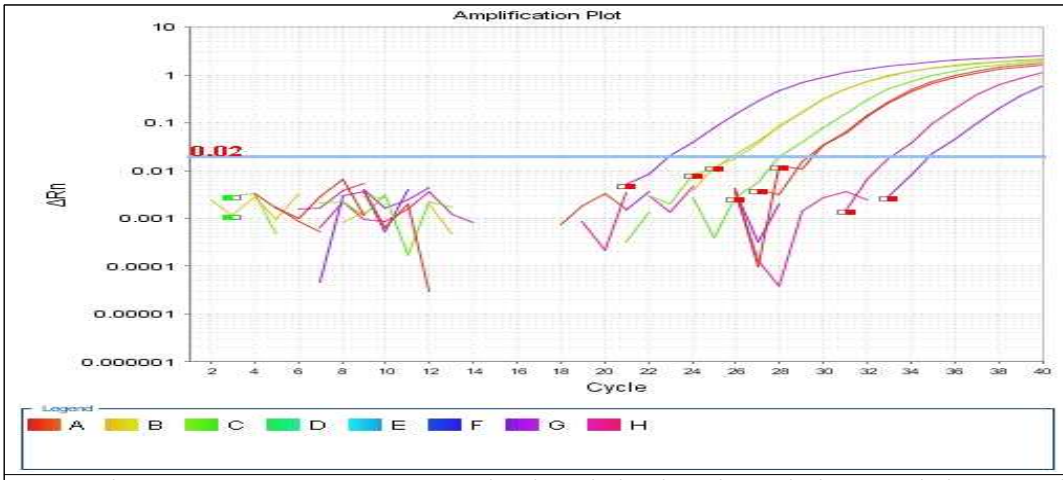


그림 83. Real time PCR을 통한 식품에서 검출된 곰팡이독소 생성 균주 확인

라. Mycotoxin과 오염된 곰팡이와의 상관관계 조사

(1) Mycotoxin이 검출된 식품에서의 곰팡이 오염 등 확인으로 상관관계조사

- 곰팡이 독소관련 연구(이인원 등, 2003)에 의하면, *F. graminearum* 균주를 배지에 25℃에 접종 후 Tricotehecene 을 추출하여 TMS를 반응시켜 GC-MS 사용하여 분석하였다. 분석 결과 153균주가 NIV(Nivalenol)과 4-acetylnivalenol을 생성하였고, 7균주는 DON(Deoxynivalneno)과 acetyldeoxynivalenol을 생성하여 우리나라 남부 지방에서 생산되는 보리기원 균주들은 NIV(Nivalenol)을 생성함을 확인하였다.
- 또한 옥수수에서 분리한 152균주의 독소 생성능은 144균주가 DON 생성균주였고, NIV 생성균주가 8균주였다. 연구결과는 우리나라에서 분포하는 *F. graminearum* 균주들의 독소 생성양상이 지역별로 서로 다르게 분포하는 것을 나타낸다. 이러한 현상은 미국을 비롯한 북미 지역에 분포하는 *F. graminearum* 균주와도 커다란 차이를 나타내고 있다.

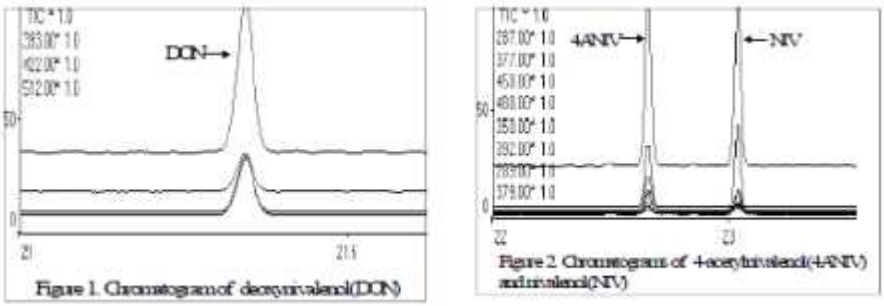


그림1.DON생성균주의 SIM 크로마토그램　　그림2. NIV생성균주의 SIM 크로마토그램

그림 84. DON, NIV 생성균주 크로마토 그램

(2) 곰팡이 생성조건 및 유지 등의 문헌조사

(가) 곰팡이독소 생성 조건 (Milani et al. 2013)

○ **Aflatoxins**

- 따뜻하고 습한 아열대 및 열대성 기후에 있는 옥수수이삭은 aflatoxin을 생성하는 *A. flavus*와 A. parasiticus의 균체형성 및 우성에 있어서 이상적인 조건에 있으며, aflatoxin은 발암물질로 상당한 경제적 영향력을 끼치는 오염물질이다. 건조스트레스를 받은 땅콩들은 꼬투리가 깨질 수 있으며 상당한 aflatoxin의 축적과 함께 *A. flavus*와 *A. parasiticus* 곰팡이에 감염될 수 있다.
- *A. flavus* 와 *A. parasiticus*에 의해 생산되는 aflatoxin은 *Aspergillus* spp. 생장과는 다른 양상을 보인다. 두 종류의 *Aspergillus* spp.에서 생성되는 aflatoxin은 33℃와 0.99Aw[수분활성도(Water activity;Aw)]에서 최적의 조건인데 반해, 두 *Aspergillus* spp. 의 생장은 35℃와 0.95Aw에서 잘 자란다. 생장과 독소생산과는 다른 조건에서 이루어짐을 알 수 있다.
- 이번 결과는 A.flavus, A.parasiticus와 A.oryzae의 생장에 있어 환경적요소의 영향을 받는 경우는 25℃일 때 최소 0.82Aw, 30℃와 37℃일 때 최소 0.81Aw라는 최근 Pitt와 Miscamble(1995)의 연구결과와 유사했다. 하지만 이번연구는 *A. flavus*와 *A.*

*parasiticus*에 의한 아플라톡신 생산의 비교를 보여주지는 않았다.

- 옥수수에서 눈에 띄게 볼 수 있는 곰팡이들은 분리균의 약 10%에 해당하는 *A. parasiticus*와 함께 *A. flavus*라는 것에 주목할 만한 가치가있다. 땅콩에서도 대다수의 분리균은 *A. parasiticus* 분리균과 함께 *A. flavus*인데, 흥미롭게도 미국에서의 연구결과를 보면 생체외 배양을 통해 A.flavus 분리균들이 대게 아플라톡신 B1과 B2를 만들어 낸다는 것을 확인했으며 *A. parasiticus*는 같은 조건에서 B_1, B_2, G_1 그리고 G_2를 만들어냈다(Dorner *et al.*, 1984). 그리고 추가로 몇몇 *A. flavus* 분리균들은 보통 시클로피아존산을 만들어냈지만 *A.parasiticus*균들은 그렇지 않은 것을 알 수 있었다.

○ Ochratoxin(OTA)

- *A. ochraceus*에서 생장하기 좋은 수분활성도(Water activity;Aw)와 온도의 범위는 OTA 생산보다 훨씬 더 넓다. 생장은 보리곡물에서 최고 약 **30**℃(Ramos et al., 199)와 함께 온도범위 **8~37**℃ (ICMSF, 1996)에서 발생한다. 분리에 따라 OTA의 최대 양은 온도와 관계없이 0.98 Aw에서 얻을 수 있다. Aw와 관련하여 Aw가 0.96~098까지 증가할 때와 미디어에 기반한 옥수수에 성장에 대해 최소값 Aw가 (25~30 ℃일 때) 0.80일 때 OTA축적과 생장 둘 다 증가하며(Marin et al., 1998) OTA에 있어서 최소값 0.83~0.87일 때 OTA축적와 생장 둘 다 증가한다(Northolt et al., 1979). food matrix와 영양상태는 OTA생산을 결정하는데 있어 매우 중요하다(Madhyastha et al., 1990).
- ***P. verrucosum*는 넓은 범위의 온도(0~35℃)에서 생장 할 수 있다. 25℃는 곡물에 있어서 OTA생산의 최적조건이지만 좋은 수분상태의 5~10℃에서 장기간 저장기간 동안 생산되어진다. 저장된 곡물의 최적 서식률은 0.95 Aw였다**. 하지만 최적의 OTA 생산은 0.90~0.95Aw였고 OTA생산량은 시간과 함께 증가했다. OTA 생산에 대한 Aw 최소값은 약 0.83~0.85Aw였고 저장 시간에 의존한다((Cairns et al., 2003; Fig. 8.8).
- *A. carbonarius*의 발아, 생장 그리고 OTA생장에 대해 환경적 매개변수들의 영향과 관련하여 아주 세세한 정보를 볼 수 있다. 최근에 Mitchell et al. (2003) and Batillani et al. (2003)는 일정 범위의 남유럽 국가에서 나온 계통에 대해 15 ℃ 와 45 ℃ 에서는 생장하지 않다는 것과 동시에 35℃에서 최고 생장이 발생하는 것을 밝혀냈다. 인공 포도주스에서 **25℃에서는 가장 폭넓은 Aw 내성을 가지고 있었으며 생장에 있어서 최적의 Aw는 0.93과 0.987Aw사이로 다양**했다. 인위적인 포도주스에서는 56일의 시간이상과 생장 (15-20 ℃; 0.85-0.90 aw)보다 높은 온도와 Aw수준에서 생산된 OTA와 함께 temporal OTA은 증가했다. 중요한 곰팡이들에 대한 더 많은 정보가 필요하겠지만 생장의 최적수준과 범위에 대한 profiles는 OTA생산과는 상당히 다르다는 것을 알 수 있다.

○ Zearalenone

- Fusarium에 의해 만들어진 제랄레논은 일교차가 클 때와 16%의 습도일 때 그리고 온도가 25℃밑일 때로 관찰되었다.(Zwierzchowski et al. 2005)

○ Deoxynivalenol

- 아프리카 지역 그리고 식품과 관련하여 데옥시니발레놀에 관한 보고서가 있는데 카메룬에서 데옥시니발레놀은 100~1300ng/g 사이의 12/15 옥수수샘플들에서 나타났다(Ngoko etal. 2001). 데옥시니발레놀의 최대양은 **30℃일 때 6주 경과와 함께 0.995Aw**인 경우로 나타났다.

표 39. 곰팡이독소 최적 온도

Mycotoxin	Temperature (℃)	Water activity
Aflatoxins	33	0.99
Ochratoxin	25-30	0.98
Fumonsin	15-30	0.9-0.995
Zearalenone	25	0.96
Deoxynivalenol	26-30	0.995
Citrinin	20-30	0.75-0.85

○ Fumonisins

- 성장하기 전인 유도기에 관한 연구로 상대적인 성장 속도와 **푸모니신 농도는 수분활동(0.93~0.995Aw)과 온도(18℃, 25℃)**로 시험관내에서 실시되었다. 옥수수 소비의 지역적 차이들과 함께 주로 온도상태와 관련하여 *Fusarium*종들과 푸모니신 발생정도를 볼 때 반드시 각 지역 음식의 푸모니신에 대한 규제수준을 설정하는 것이 필요했다. Sanchis와 Magan(2004)은 15~30℃의 온도와 0.9~0.995Aw를 독소발생의 최적조건으로 보고했다.

○ Citrin

- 독소생산은 종들에 따라 **온도가 20~30℃ 그리고 Aw가 0.75~0.85aw**일 때 발생한다.(Frank 1992) 특히 더운 나라에서 균이 오염된 주요 음식들에 경우 독소는 심각한 문제를 야기한다.

○ *Alternaria* 곰팡이 독소

- 식물 병원균으로 알려진 많은 것들과 함께 genus *Alternaria*는 토양과 기생 식물표면에 넓게 분포 돼있다. 균들은 낮은 온도에서도 생장하는 것으로 알려졌으며 냉각 된 채 수송과 저장되는 과일과 야채들의 부패와 대부분 연관되어져있다. *A. alternata*는 특히 경작가능곡물을 생산하는 지역의 airspora에서 발견되어지는 일반적인 포자이다. 곡물을 숙성하는 곳에 많이 서식해있으며 이것은 밀곡물에서 가장 일반적으로 표피밑에 생기는 곰팡이로 여겨지고 있다(Hyde and Galleymore, 1951).
- *A. triticina*처럼 *A. alternata*와 여러 곰팡이들은 밀알갱이가 검은색 또는 갈색으로 착색되도록 하는데, 이것을 검은점질병이라고 불려지며 농작물생산과 곡물의 품질에 영향을 끼칠 수 있다. 다른 Alternaria 종들은 토마토와 당근 그리고 배추속 식물들에 있어 중요한 병원균이다.
- *Alternaria* 종들에의해 생산되는 독성과 함께 가장 중요한 부차적인 신진사대물은 the dibenzo-α-pyrones altenuene (AE), alternariol (AOH), alternariol monomethyl ether (AME) 그리고 derivative of tetramic acid, tenuazonic acid 이다 (Meronuck et al., 1972; Pero et al., 1973; Harvan and Pero, 1976).
- 밀, 토마토, 수수, 피칸 그리고 목화에서 몇몇 또는 이들 mycotoxins 전부는 *Alternaria*에 의해 만들어지는 것으로 입증되었다. 그러나 몇몇 연구에서는 *Alternaria*종에 의한 발아, 생장 그리고 mycotoxin 생산에 대해 two-dimensional profiles을 만들어 내기위해

시도해왔지만 이용 가능한 정보는 오직 *A. alternata*와 *A. tenuissima* 뿐이었다.

- 게다가 mycotoxin 생산과 생장간의 비교는 온도범위가 AE와 AME 그리고 AOH보다 좁은 것을 보여준다. **AW의 완벽한 발아를 위한 조건은 대략 0.86 Aw이며, 성장과 3개의 Mycotoxin의 생산을 위해서는 대략 0.88~0.89 이다. 세 개 모든 mycotoxin에 있어서 최고의 조건은 대략 오차범위 25 ℃ and > 0.97 Aw**이다.
- 수수와 목화씨에 대해 *A. alternata*와 *A.tenuissima* 종들의 tenuazonic acid (TA) 생산에 관한 몇몇 생태학적 연구를 수행했다 (Young et al., 1980; Magan and Baxter 1994). 그림 8.2는 수수곡물에 있어 수분활동과 시간이 *A. alternata*에 의한 TA생산에 영향을 주고 있음을 보여준다. 미디어에 기반된 수수에 대한 연구진행과정에서 생산을 위한 *최소한의 수분 활동조건은 약 0.93~0.90Aw*라는 것이 밝혀졌다.
- 목화씨에 있어 ***A. tenuissima*에 의한 TA생산의 최고 환경조건은 20 ℃/37.5 % mc였다**. 수분 이용의 절대적인 제한 조건은 14.9% 이었다(=0.85 Aw). 하지만 Aw는 이들 연구에서 정확히 통제되지 않았다. 즉각적인 습도 수준들(=0.95Aw)에서 50%감소가 기록되었다. 그것은 > 0.90Aw와 20ºC가 TA생산을 위해 필요하다는 것을 암시한다. 다른 온도들은 *Alternaria*에 의한 다른 mycotoxin의 생합성에 알맞았다. Visconti et al. (1992)은 평지씨로부터 *Alternaria*에 대한 TA 생산수준이 비슷하다는 것을 발견했지만 온도 또는 수분 활동 측면들은 자세하게 고려하지 않았다.

(나) Mycotoxin in food (N. Magan and M. Olsen)

○ **보관시 mycotoxin 생산에 영향을 주는 요인들**

- **곰팡이의 생장 조건은 mycotoxin생산을 위해 요구되는 것과는 항상 일치하지 않다; 그러므로 곰팡이는 곡물에서 mycotoxin생산 없이 자라고 증식될 수 있다는 것이다. 반면에 moulds가 사라진지 오랜 시간 후에도 독소는 남아있을 수 있기 때문에 mycotoxigenic fungi가 없다고 해서 한 상품이 mycotoxin으로부터 자유롭다고는 보장할 수 없다.**
- 하지만 관련된 모든 매개변수들 사이의 상호작용에서 발생할 수 있는 결과들이 있으며 그 결과들을 밝히는 것은 매우 중요하다. mycotoxin생산에 영향을 주는 것으로 알려진 비교적 많은 매개변수들은 보관시 mycotoxin생산에 대한 예측모델의 계획안들을 복잡하게 만든다. 그러므로 실제 보관환경에서 mycotoxin형성에 관한 연구를 하는 것이 반드시필요하다.
- 보관시 mycotoxin생산에 영향을 미치는 주요 매개변수에는 **aw, 온도, the intergranular gas composition, 곡물 구성성분(지방,단백질), 곡물상태, 그리고 미생물(균)의 상호작용 (suppressive or stimulating effects)**이 있다. 하지만 곰팡이생장에 영향을 주는 매개변수의 경우와 같이 mycotoxin생산을 조절하는 모든 매개변수 사이에 상호작용 또한 있다. mycotoxin 생산이 매개변수 각각에 영향을 받는데, fungi 각각 그 기준치가 서로 다르다.

○ **곰팡이 성장에 영향을 미치는 실내 조건**

- 통풍과 표면온도에 있어서 지역차이는 한 공간의 매우 높은 Aw나 낮은 상대습도와 함께 미기후(micro-climates)를 만들어낼 수 있다는 것을 이해하는 것이 필요하다. 건축자

재에서 *penicillia*와 *Aspergilli*와 같은 건성곰팡이들은 substrate의 요소에 따라 0.78~0.90사이의 Aw값일 때 자랄 수 있다.

제 3 장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

제 1 절 평가의 착안점 및 기준

구분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	척도 (점수)
1차년도 (2016)	○ Immuno-PCR을 이용한 3종 Mycotoxins(Aflatoxin B_1, Deoxynivalenol, Ochratoxin A) 정량분석법 개발	40
	○ Mycotoxins 오염수준예측 및 인체위해 용량 제시	40
	○ 단클론 항체(3종 mycotoxins) 생산 공정 확립	10
	○ 단클론 항체(3종 mycotoxins) 신규 개발	10
2차년도 (2017)	○ Immuno-PCR을 이용한 3종 Mycotoxins(Aflatoxin M_1, T-2, Zearalenone) 정량분석법 개발	20
	○ 3종 Mycotoxins (Aflatoxin B_1, Deoxynivalenol, Ochratoxin A) 정량 키트 시제품 개발	20
	○ 3종 Mycotoxins 진단키트 유효성 평가	20
	○ Mycotoxins fungi 검출하기 위한 RT-PCR법 개발	30
	○ 단클론 항체(3종 mycotoxins) 생산 공정 확립	10
3차년도 (2018)	○ 3종 Mycotoxins(Aflatoxin M_1, T-2, Zearalenone) 정량 키트 시제품 개발	50
	○ 3종 Mycotoxins 진단키트 유효성 평가	50
최종평가	○ 단클론 항체(3종 mycotoxins) 신규 개발	10
	○ Immuno-PCR을 이용한 mycotoxins 정량분석법 개발	30
	○ Mycotoxins 정량 키트 시제품 생산	30
	○ 시제품 유효성 평가	10
	○ Mycotoxins fungi 검출하기 위한 RT-PCR법 개발	20

제 2절 관련분야의 기술발전에의 기여도

ㅇ 식품제조업체 기술연구소, 식품의약품안전처, 농림축산검역본부, 보건환경연구원 등의 정부기관, 식품연구소 등의 분석기관에서 적용 가능

ㅇ Mycotoxins의 노출량 추정에 따른 합리적인 정부의 정책 및 관리 방안 마련이 가능

ㅇ 6종의 mycotoxins 특이항원 확보 및 항체 생산기술 확보

- 6종의 mycotoxins에 대한 단클론 항체의 대량 생산 기술 확보와 생산된 항체의 특이성 검증기술을 습득

ㅇ Immuno-PCR법을 이용한 연구개발은 활발하게 이루어지고 있지만 아직까지 상품화된 것은 없는 상황임. 본 과제를 통해 개발한 immuno-PCR법을 이용한 mycotoxin 정량화 키트는 최초의 제품이 될 것으로 판단됨.

- ELISA 방법과 Real Time - PCR을 이용한 제품개발 기술을 확보하였으며, 고정화 항체 및 항체 접합체의 안정화 기술 습득 등을 통해서 실전적 경험 축적과 전문인력 양성 및 시스템 구축

제 4 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 활용계획

○ Mycotoxins의 오염도 추정에 따른 합리적인 정부의 정책 및 관리 방안 마련이 가능
- Farm to Table까지의 농산물에 대한 mycotoxins 오염현황 파악
. 농산물의 유통단계별 오염도 및 노출량 파악
. 시중에 유통 중인 농산물에서의 오염도 확인
. 농산물에 올바른 조리 방법에 대한 Guideline 제시

○ 식품안전성 평가에서 과학적 접근 방식 도입 유도
. HACCP과 더불어 식품안전성 평가에 보다 과학적으로 접근

○ 농산물 중 mycotoxins 정량 기준 설정에 기초자료를 제공

○ 농산물 생산, 보관 및 유통 단계에서의 mycotoxins 관리 지침 제시

○ 농산물의 mycotoxins 정량기준 설정 및 식품의 보존 유효기간 제시

○ Mycotoxins에 대한 위해성 평가에 활용

나. 기대성과

1) 기술적 측면

○ Mycotoxins의 특이항원 확보 및 항체 생산기술 확보
- 각각 mycotoxins에 대한 단클론 항체의 대량 생산 기술 확보와 생산된 항체의 특이성 검증기술을 습득

○ Immuno-PCR법을 이용한 많은 연구는 되고 있지만 mycotoxins에 대한 정량방법은 아직까지 상품화를 시키지 못한 상황이지만 본 개발을 통해 산업화를 할 수 있는 기술을 확보함.
- ELISA 방법과 real time PCR을 이용한 제품개발 기술을 확보하고, 고정화 항체 및 항체 접합체의 안정화 기술 습득 등을 통해서 실전적 경험 축적과 전문인력 양성 및 시스템 구축

2) 경제・산업적 측면

○ 생산부터 소비자까지의 각 단계별 mycotoxins 오염 정도를 파악할 수 있으므로 안전한 농산물 생산으로 소비자의 신뢰가 높아가 국내산 농산물의 소비촉진 및 국내 농산물 생산농가의 수입이 증가 예상

○ 개발된 예측 모델은 생산, 유통 등 산업체의 각각의 단계에서 과학적인 Critical point를 제시함으로써 경제적인 측면뿐만 아니라 효율적인 관리를 구현

붙임. 참고문헌

Alassane-Kpembi I., Puel O., Pinton P., Cossalter A.M., Chou T.C., Oswald I.P.: Co-exposure to low doses of the food contaminants deoxynivalenol and nivalenol has a synergistic inflammatory effect on intestinal explants. *Arch. Toxicol.,* **91**(7), 2677-2687. doi: 10.1007/s00204-016-1902-9(2017).

Amar AB, Oueslati S, Ghorbel A and Mliki A, 2012, Prediction and early detection of mycotoxigenic Fusarium culmorum in wheat by direct PCR-based procedure, Food Control, 23:506~510

Andersen B, Smedsgaard J, Jorring I, Skouboe P and Pedersen LH, 2006, Real-time PCR quantification of the AM-toxin gene and HPLC qualification of toxigenic metabolites from Alternaria species from apples, International Journal of Food Microbiology, 111:105~111

Atoui A, Khoury AE, Kallassy M and Lebrihi A, 2012, Quantification of Fusarium graminearum and Fusarium culmorum by real-time PCR system and zearalenone assessment in maize, International Journal of Food Microbiology, 154:59~65

Babu D and Muriana PM, 2011, Immunomagnetic bead-based recovery and real time quantitative PCR (RT iq-PCR) for sensitive quantification of aflatoxin B_1, Journal of Microbiological Methods, 86:188~194

Bahobail A., Hassan S.A., El-Deeb B.A.: Microbial quality and content aflatoxins of commercially available eggs in Taif, Saudi Arabia, *African J. of Microbio. Resear.,* **6**(13), 3337-3342 (2012).

Battilani P, Pietri A, Giorni P, Bertuzzi T and Carbano C, 2003, Growth and ochratoxin A production of Aspergillus section Nigri isolates from Italian grapes, Aspects of Applied Biology, 68: 175-80.

Cabañes FJ, Accensi F, Bragulat MR, Abarca ML, Castella G, Minguez S and Pons A, 2002, What is the Source of Ochratoxin A in Wine? International Journal of Food Microbiology, 79: 213-15.

Chen M., Hsu Y., Wang T., Chien S.: Mycotoxin monitoring for commercial foodstuffs in Taiwan. *J. fd. drug analysis,* **24**(1), 147-156 (2016).

Cheraghali A.M., Yazdanpanah H., Doraki N., Abouhossain G., Hassibi M., Ali-abadi S., Aliakbarpoor M., Amirahmadi M., Askarian A., Fallah N., Hashemi T., Jalali M., Kalantari N., Khodadadi E., Maddah B., Mohit R., Mohseny M., Phaghihy Z., Rahmani A., Setoodeh L., Soleimany E., Zamanian F. : Incidence of aflatoxins in Iran pistachio nuts. *Fd. Chem. Toxicol.,* **45**(5), 812-816 (2007).

Chun, H.S. and Chung, S.H. : Safety evaluation for mycotoxins in foods. The annual report of MFDS, **8**, 287-311 (2009).

Cunha, S.C., Sá, S., Fernandes, J.O.: Multiple mycotoxin analysis in nut products: Occurrence and risk characterization, *Fd. Chemical Toxicology,* doi: 10.1016/j.fct.2018.02.039 (2018).

De Ruyck K., De Boevre M., Huybrechts I., De Saeger S. : Dietary mycotoxins, co-exposure, and carcinogenesis in humans: Short review. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.,* **766**, 32-41. doi: 10.1016/j.mrrev.2015.07.003(2015)

Demeke T, Grafenhan T, Clear RM, Phan A, Ratnayaka I, Chapados J, Patrick SK, Gaba D, Levesque CA and Seifert KA, 2010, Development of a specific TaqMan® real-time PCR assay for quantification of Fusarium graminearum clade 7 and comparison of fungal biomass determined by PCR with deoxynivalenol content in wheat and barley, International Journal of Food Microbiology, 141:45~50

Denschlag C, Rieder J, Vogel RF and Niessen L, 2014, Real-time loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for group specific detection of important trichothecene producing Fusarium species in wheat, International Journal of Food Microbiology, 177:117~127

Diella G, Caggiano G, Ferrieri F, Ventrella A, Palma M, Napoli C, Rutigliano S, Lopuzzo M, Lovero G, Montagna MT.: Aflatoxin contamination in nuts marketed in Italy: preliminary results. *Ann Ig.,* **30**(5), 401-409. doi: 10.7416/ai.2018.2240 (2018).

Dorner JW, Cole RJ and Diener UL, 1984, Dorner J W, Cole R J, Diener U L (1984), The relationship of

Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus with reference to production of aflatoxins and cyclopiazonic acid, Mycopathologia, 87: 13-15.

Essawet N., Abushahma H., Inbaia S., Najii A., Amra H.A.: Natural Incidence of Aflatoxins and Ochratoxin A Nuts Collected from Local Market in Tripoli. *Intern. J. Current Microbio. Appl. Scien.*, **6**(3), 1479-1486 (2017).

Fredlund E, Gidlind A, Olsen M, Borjesson T, Spliid N and Simonsson M, 2008, Method evaluation of Fusarium DNA extraction from mycelia and wheat for down-stream real-time PCR quantification and correlation to mycotoxin levels, Journal of Microbiological Methods, 73:33~40

Geisen R, Mayer Z, Karolewiez A and Farber P, 2004, Development of a Real Time PCR System for Detection of Penicillium nordicum and for Monitoring Ochratoxin A Production in Foods by Targeting the Ochratoxin Polyketide Synthase Gene, System. Apple. Microbiol, 27:501~507

Gutleb A, Caloni F, Giraud F, Cortinovis C, Pizzo F, Hoffmann L, Bohn T and Pasquali M, 2015, Detection of multiple mycotoxin occurrences in soy animal feed by traditional mycological identification combined with molecular species identification, Toxicology Reports, 2:275~279

Haas D, Pfeifer B, Reiterich C, Partenheimer R, Reck B and Buzina W, 2013, Identification and quantification of fungi and mycotoxins from Pu-erh tea, International Journal of Food Microbiology, 166:316~322

Haugland RA, Varma M, Wymer LJ and Vesper SJ, Quantitative PCR Analysis of Selected Aspergillus, Penicillium and Paecilomyces Species, System. Apple. Microbiol, 27:198~210

Hayat A, Paniel N, Rhouati A, Marty JL and Barthelmebs L, 2012, Recent advances in ochratoxin A-producing fungi detection based on PCR methods and ochratoxin A analysis in food matrices, Food Control, 26:401~415

Heydt MS and Geisen R, 2007, A microarray for monitoring the production of mycotoxins in food, International Journal of Food Microbiology, 117:131~140

Hui YX, Jun KW, Hua YM, Ming Z and Zhen O, 2013, Application of Aptamer Identification Technology in Rapid Analysis of Mycotoxins, Chin J Anal Chem, 41:297~306

ICMSF (International Commission on Microbiological Specification for Foods), 1996

Iheanacho H, Dutton M, Steenkamp P, Steenkamp L, Makun H, Swart A and Mthombeni J, 2014, Real time PCR of Nor~1 (aflD) gene of aflatoxin producing fungi and its correlative quantization to aflatoxin levels in South African compound feeds, Journal of Microbiological Methods, 97:63~67

Kim DM, Chung SH and Chun HS, 2011, Multiplex PCR assay for the detection of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic fungi in meju, a Korean fermented soybean food starter, Food Microbiology, 28:1402~1408

Kim J., Kim Y., Lee C., Seo M., Jang M., Ku E., Park K., Yoon M., A Study on the Safety of Mycotoxins in Grains and Commonly Consumed Foods. *J. Food Hyg. Saf.* **32**(6), 470-476 (2017).

Kos J., Janić Hajnal E., Jajić I., Krstović S., Mastilović J., Šarić B., Jovanov P.: Comparison of ELISA, HPLC-FLD and HPLC-MS/MS Methods for Determination of Aflatoxin M1 in Natural Contaminated Milk Samples. *Acta Chim. Slov.,* **63**(4), 747-756 (2016).

Lacey J, 1986, Water availability and fungal reproduction: patterns of spore production, liberation and dispersal, in Ayres P G and Boddy L, Water, Fungi and Plants, Cambridge, Cambridge University Press, 65-86.

Lee S., Kim M., Oh S., Chun H.S.: Trends in Researches of Fusarium Mycotoxins, T-2 toxin and HT-2 toxin in Domestic and Foreign Countries, *J. Fd Hyg. Safety,* **27**(1), 1~17 (2012).

Magan N and Lacey J, 1984b, Water relations of some Fusarium species from infected wheat ears and grain, Transactions of the British Mycological Society, 83: 281-5.

Magan N and Lacey J, 1985, The effect of water activity and temperature on mycotoxin production by Alternaria alternata in culture and on wheat grain, in Lacey J, Trichothecenes and Other Mycotoxins, Chichester, John Wiley and Sons, 243-560.

Meronuck RA, Steele JA, Mirocha CJ and Christensen CH, 1972, Tenuazonic acid, a toxin produced by Alternaria alternata, Applied Microbiology, 23: 613-17.

Milani J.M., 2013, Ecological conditions affecting mycotoxin production in cereals: a review, Veterinarni Medicina, 58(8): 405-411

Ministry of food and drug safety, Risk profiles (Mycotoxins), (2016)

Mislivic PB and Tuite J, 1970, Temperature and relative humidity requirements of species of Penicillium isolated from yellow dent corn, Mycologia, 62: 75-88.

Mitchell D, Aldred D and Magan N, 2003, Impact of ecological factors on growth and ochratoxin A production by Aspergillus carbonarius from different regions of Europe, Aspects of Applied Biology, 68: 109-16.

Morello LG, Sartori D, Martinez AL, Carneiro Vieira ML, Taniwaki MH and Pelegrinelli Fungaro MH, 2007, Detection and quantification of Aspergillus westerdijkiae in coffee beans based on selective amplification of β-tubulin gene by using real-time PCR, International Journal of Food Microbiology, 119:270~276

Mostafa AT, Armin A, Hamid P and Reza AM, 2012, Rapid Detection Methods for Analysis of Fungi and Mycotoxins in Agriculture Products, Research Journal of Recent Sciences Vol.1:90~98

Mounir A., Cooper C.: Determination of Aflatoxins in Foods Using HPLC and a Commercial ELISA System. *J. Food Prot.,* **54**(4), 291-294 (1991).

Mule G, Susca A, Logrieco A, Stea G and Visconti A, 2006, Development of a quantitative real-time PCR assay for the detection of Aspergillus carbonarius in grapes, International Journal of Food Microbiology, 111:S28~S34

Niessen ML and Vogel RF, 1998, Group specific PCR-Detection of Potential Trichothecene-Producing Fusarium-Species in Pure Cultures and Cereal Samples, System. Appl. Microbiol, 21:618~631

Northolt MD and Bullerman LB, 1982, Prevention of mould growth and toxin production through control of environmental conditions, Journal of Food Protection, 45: 519-26.

Park M.J., Yoon M.H., Hong H.G., Joe T.S., Lee I.S., Park J.H., Ko H.U.: A study on the conditions of mycotoxin production based on the aflatoxin contents and production in food. *The Report of Gyeonggi-do Insititute of Health and Environment,* 183-188 (2007).

Pavon MA, Gonzalez I, Pegels N, Martin R and Garcia T, 2010, PCR detection and identification of Alternaria species-groups in processed foods based on the genetic marker Alt a 1, Food Control, 21:1745~1756

Pavon MA, Luna A, Cruz S, Gonzalez I and martin R, 2012, PCR-based assay for the detection of Alternaria species and correlation with HPLC determination of altenuene, alternariol and alternariol monomethyl ether production in tomato products, Food Control, 25:45~52

Pero RW, Posner M, Harvan D and Spalding JW, 1973, Toxicity of metabolites produced by Alternaria, Environmental Health Perspectives, June, 87-94.

Rajeev B., Ravishankar V., Rai, Karim, A.A.: Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns. *Comprehensive reviews in Food science and Food safety,* https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00094.x (2009)

Rodriguez A, Rodriguez M, Andrade MJ and Cordoba JJ, 2012, Development of a mutiplex real-time PCR to quantify aflatoxin, ochratoxin A and patulin producing molds in foods, International Journal of Food Microbiology, 155:10~18

Serna JG, Vazquez C, Sardinas N, Gonzalez Jaen MT and Patino B, 2009, Discrimination of the main

Ochratoxin A-producing species in Aspergillus section Circumdati by specific PCR assays, International Journal of Food Microbiology, 136:83~87

Song, H.H., Kim, J. and Lee, C.: A review of mycotoxins from Fusarium species. *Safe Food,* **1**, 19-28 (2006).

Stakheev A, Ryazantsev D, Gagkaeva T and Zavriev S, 2011, PCR detection of Fusarium fungi with similar profiles of the produced mycotoxins, Food Control, 22:~462~468

Storari M, Dennert FG, Bigler L, Gessler C and Broggini GA, 2012, Isolation of mycotoxins producing black aspergilli in herbal teas available on the Swiss market, Food Control, 26:157~161

Sweeney MJ and Dobson AD, 1998, Mycotoxin production by Aspergillus, Fusarium and Penicillium species, International Journal of Food Microbiology, 43:141~158

Turner N.W., Subrahmanyam S., Piletsky S.A.: Analytical methods for determination of mycotoxins.: a review. *Anal. Chim. Acta,* **632**(2),168-180. doi: 10.1016/j.aca.2008.11.010. (2009)

Vujanovic V and Chau HW, 2012, Monitoring Fusarium complex mycelia replacement by mycopathogenic Sphaerodes using alcohol percentage test, qRT-PCR and HPLC, Physiological and Molecular Plant Pathology, 80:28~34

Xu F, Weijun K, Meihua Y and Zhen O, 2012, Latest Advancement for Detection Methods of Mycotoxins in Traditional Chinese Medicine, Mode Tradit Chin Med Mater Med, 14:1944~1952

Yeni F, Acar S, Polat OG, Soyer Y and Alpas H, 2014, Rapid and standardized methods for detection of foodborne pathogens and mycotoxins on fresh produce, Food Control, 40:359~367

Young AB, Davis ND and Diener UL, 1980, The effect of temperature and moisture on tenuazonic acid production by Alternaria tenuissima, Phytopathology, 70: 607-9.

Zachariasova, M., Hajslova, J., Kostelanska, M., Poustka, J., Krplova, A., Cuhra, P., Hochel, I.: Deoxynivalenol and its conjugates in beer: a critical assessment of data obtained by enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta,* **625,** 77-86 (2008).

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.