

## 穀類中 Ochratoxin A의 檢索을 爲한 免疫分析法에 關한 研究

김동술 · 정덕화\* · 이용욱\*\*

국립보건원 미생물부, \*경상대학교 식품공학과, \*\*서울대학교 보건대학원

## Study on the Analysis Method of Ochratoxin A in Cereals by ELISA Method

Dong-Sul Kim, Duck-Hwa Chung\* and Yong-Wook Lee\*\*

Department of Microbiology, National Institute of Health

\*Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National University

\*\*Graduate School of Public Health, Seoul National University

### ABSTRACT

We established ELISA method which is more rapid and safe than conventional analytical method, and then analyzed concentration of ochratoxin A in the rices by ELISA method. The results were as follows :

1. Since ochratoxin A molecular does not contain the group for coupling reaction, it was first proposed to have the function of an antigen. As a result of conjugation of ochratoxin A-BSA derivatives, one molecular of BSA was conjugated with 13 moleculars of ochratoxin A.
2. On the basis of established ELISA to apply for immuno analytical method of ochratoxin A, the minimal level of detection by ELISA method was at 0.5 ppb.
3. Rices (42) were collected from homes of Kyoungnam districts through November 1992 to December 1992, as a result of analysis, two of these were positive. Rice samples of R-1 and R-9 represented ochratoxin A levels of 6.0 ng/g and 10 ng/g, respectively.

**Keywords :** Ochratoxin A, ELISA method, BSA.

### I. 서 론

Ochratoxin A는 isocoumarin을 함유하는 강한 독성의 mycotoxin으로 사람 및 가축에 치명적인 손상을 주어 급성 지방변성을 일으키고<sup>1,2)</sup> 간의 gly-cogen합성효소를 저해하며 특히 면역작용을 저해하여 사람에게 Balkan endemic nephropathy 등의 만성질환을 일으키는 nephrotoxin이다.<sup>3, 5)</sup>

곡류중에 ochratoxin A가 처음 발견된 것은 1963년 미국에서 시판되고 있는 옥수수 사료였으며, 이때 오염농도는 110~150 ppb정도였다. 그 이후 캐나다에서도 ochratoxin A가 함유된 밀 19건이 발견되었으며 오염수준은 30 ppm이었으며 덴마크에서 33건의 보리에서 57.5%인 19건에서 ochratoxin A의

오염이 확인되었고 덴마크와 스웨덴에서 신장질환을 앓고 있는 돼지의 장기 등에서 ochratoxin A가 검출되었다. 또한 발칸반도성 질환이 만연되어 있는 유고슬라비아 지방에서 생산된 736점의 곡류와 32점의 빵을 분석한 결과 곡류에서 8.7%와 빵에서 18.8%의 ochratoxin A가 검출되었다. 이때 오염된 곡류의 33%가 100 µg/kg이상이었다. 따라서 발칸반도성 신장독은 ochratoxin A에 오염된 식품을 섭취함으로써 기인되는 것으로 보고되고 있다.<sup>6- 8)</sup>

최근 세계 각국에서는 농산물을 비롯한 식품에서의 mycotoxin오염문제를 중요하게 취급하고 이에 대한 법적 허용규제한도를 설정하여 농산물 등에 ochratoxin A에 대한 오염여부를 엄격히 검색하고 있으나, 우리나라의 경우는 aflatoxin B<sub>1</sub>에 대한 잠정

허용기준 이외에는 미흡한 편이다. 1994. 4. 15일 마라카시에서 열린 관세무역 일반협정(GATT)각료 회의에서 최종의정서와 세계무역기구(WTO)설립 협정에 협상참여국들이 서명함으로써 우루과이라운드(UR)협상이 종결되고, 세계무역기구(WTO)의 출범과 함께 위생 및 동·식물검역규제안(Sanitary and Phytosanitary Restrictions : SPSR)이 체결됨으로 인해 수입농산물의 개방화로 인해 다종다량의 농산물이 수입됨에 따라 오염농산물의 수입이 늘어날 소지가 있으므로 이에 대한 법적규제와 검색업무를 위한 제도적 장치가 요구된다. 이를 위해서는 무엇보다도 체계적인 연구결과가 뒷받침되어야 한다. 유럽을 비롯한 선진 각국에서는 식품 및 농산물중에 ochratoxin A의 오염량을 신속, 정확하고 안전한 방법으로 측정하기 위하여 오랜 연구와 기술축적을 바탕으로 면역분석법(ELISA)을 개발하는 등 곰팡이독에 대한 활발한 연구<sup>11)</sup>가 이루어지고 있으나, 국내의 연구 수준은 thin layer chromatography(TLC)와 high performance liquid chromatography(HPLC) 등의 방법에 의존하고 있다. 이들 방법은 추출과 정제에 많은 시간과 유기용매가 다량 소비되고, 넓은 공간, 많은 기구 그리고 전문인력을 필요로 하며 경제성이 없을 뿐 아니라 처리과정에서 수반되는 안전성 문제로 실험의 한계성이 노출되었다.

따라서 지금까지의 유기화학분석에 의존했던 저분자 화합물인 ochratoxin A를 신속, 정확하고 안전한 분석을 위해 본 연구는 곡류중 ochratoxin A의 검색을 위한 ELISA법을 확립하여 결과를 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

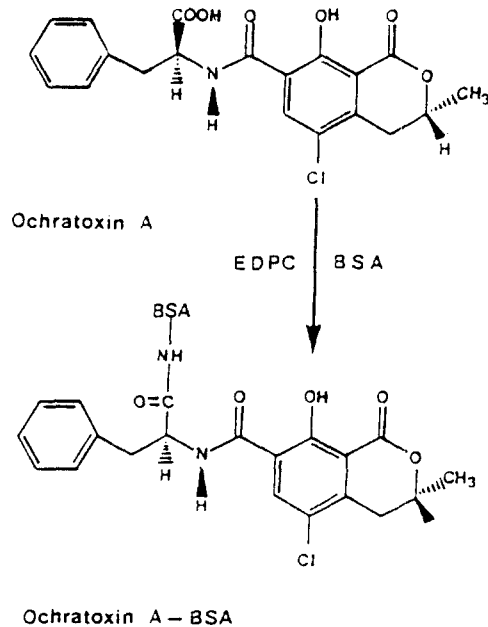
### 1. 재 료

Ochratoxin A의 오염정도를 측정하기 위한 실험 재료는 1992년 11월부터 12월 사이에 경남지역의 5개 지역으로부터 시료를 수집하였으며, 이때 수집한 시료는 Table 1에서 보는 바와 같다.

또한 실험에 사용한 Ochratoxin A, BSA(bovine serum albumin), OVA(ovalbumin), Tween 20(polyoxyethylene sorbitan monolaurate), TMBZ(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine), RPMI-1640(cell culture media), charcoal(Darco G-60), alumina(80~200 mesh) 등은 Sigma사, LPS(lipopolysaccharide), ConA(concavalin A)는 Difco사, glutaric anhydride, DMF(dimethyl formamide), PBS(phosphate buffer saline, 인산완충염수), EDPC[1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)

**Table 1.** Sampling sites of rice from Kyoung-Nam district for ochratoxin A determination by indirect competitive ELISA

Sampling sites	No. of samples
Kimhae	7 (R 1~ 7)
Sachun	5 (R 8~ 12)
Chungmu	10 (R13~22)
Jinju	10 (R23~32)
Kyuchang	10 (R33~42)
Total	42



**Fig. 1.** Schematic diagram for the preparation of ochratoxin A-BSA conjugate. BSA : bovine serum albumin. EDPC : 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide.

carbodiimide]는 Aldrich사로부터 구입하여 사용하였으며, 그의 시약은 특급시약이었다.

### 2. Ochratoxin A-BSA conjugate의 합성

기존의 TLC 및 HPLC법에 의한 ochratoxin A의 분석 방법 개선을 위해 면역분석기법을 응용하려는 시도를 행하였다. 우선 indirect competitive ELISA법을 확립하기에 앞서 microtiter plate에 coating할 ochratoxin A-BSA conjugate의 합성을 Kawamura 등<sup>12)</sup>의 방법을 참고하여 Fig. 1과 같은 반응을 거쳐

이행하였다. 즉, 5 mg의 ochratoxin A를 ethanol 0.12 ml에 용해시켜서 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0) 3 ml를 첨가하여 준비하였다.

또한, BSA 50 mg은 0.1 M NaCl 5 ml에 용해시켜서 25 mg의 EDPC를 첨가하여 앞서 준비한 용액을 서서히 혼합하여 실온에서 20시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 반응물은 0.01 M tris buffer(pH 8.5)에서 12시간 동안 투석하였다. 투석이 완료된 용액을 Sephadex G-75 column에 통과시켜 spectrophotometer를 이용하여 peak를 확인하고 각 fraction을 수집하였다. 분리된 fraction은 다시 3차 증류수에 3일간 투석시킨 후 동결건조시켜  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 보존하면서 실험에 사용하였다

### 3. Ochratoxin A-BSA conjugate의 확인 방법

합성된 ochratoxin A-BSA 결합체에서 BSA 한분자당 결합된 ochratoxin A의 반응비율은 다음과 같이 Lowry법<sup>13)</sup>에 준하여 계산하였다. 즉, spectrophotometer를 이용하여 ochratoxin A-BSA의 순수한 단백질량을 정량한 다음, 단백질 농도를 알고 있는 ochratoxin A-BSA의 일정량을 취하여 동량의 7 N-NH<sub>3</sub>OH 용액을 첨가하여 실온에서 6시간 동안 반응시켜 가수분해하였다. 이 추출물을 질소하에서 증발농축시킨 후 hot methanol을 가하여 천천히 반응시켰다. 상층액을 취하여 다시 질소하에서 증발농축시켜 chloroform을 천천히 가하여 반응시키는 조작을 반복하여 acetonitrile + water + acetic acid (99+99+1) 용액을 가하여 용해시킨 후 HPLC로 분석하였다.

### 4. ELISA법의 활용

#### 1) Ochratoxin A 생성균주의 검색

균원시료로부터 순수분리된 *Aspergillus* spp.와 *Penicillium* spp. 균주를 배양하여 얻은 배양물 추출액을 ELISA법으로 ochratoxin A 생성여부를 조사하였다. 즉, YES broth에서 배양한 배양물을 멸균한 후 배지 동량의 ethyl acetate를 첨가하여 유기용매층을 회수하여 speed vacuum concentrator에서 농축시켰다. 농축이 끝난 후 10% methanol PBS-tween 용액을 가하여 ELISA법을 행하였다.

#### 2) ELISA용 시료조제 및 분석

ELISA법으로 분석하기 위해 채취한 시료를 mixer에서 분말화하여 쌀가루 1g에 methanol 1ml와 PBS-tween 9ml를 첨가하여 vortex mixer에서 혼합한 후 최종 methanol 농도가 10%되게 한 후 추출하였다. 이것을 5,000 rpm의 원심분리기에서 5분

동안 원심분리하여 상층액을 취하여 ELISA를 행하였다.

## III. 결과 및 고찰

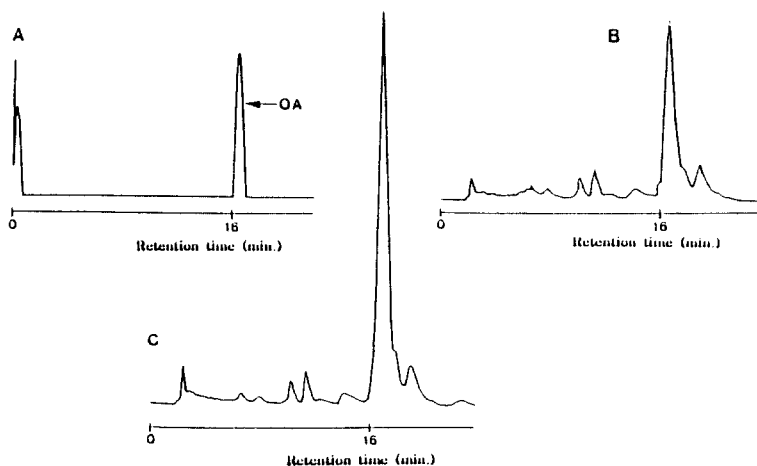
### 1. Ochratoxin A-BSA conjugate의 합성

Ochratoxin A의 경우 구조상 단백질과 결합할 수 있는 coupling site를 가지고 있으므로 직접 단백질과 conjugate 합성이 가능하였다. 즉, 실험방법에서 언급한 바와 같이 Kawamura 등<sup>12)</sup>의 방법에 따라서 ochratoxin A-BSA conjugate를 조제하였다. 합성된 conjugate는 투석시켜 정제한 후 Lowry법<sup>13)</sup>으로 ochratoxin A-BSA의 단백질 함량을 측정하고 일정량의 ochratoxin A-BSA에 7 N-NH<sub>3</sub>OH 용액을 가하여 가수분해시킨 후 단백질 분자 주위에 결합하고 있는 ochratoxin A의 수를 HPLC법으로 분석하였다. 그 결과 단백질(BSA) 1 M당 약 13 M의 ochratoxin A가 결합된 것으로 나타났다. 특히 BSA와 결합한 ochratoxin A의 확인을 위해 ochratoxin A-BSA conjugate를 가수분해시킨 후 HPLC법으로 분석하여 BSA에 결합된 ochratoxin A를 Fig. 2와 같이 확인하였다.

한편, Kawamura 등의 실험결과는 한 분자의 단백질에 16.7 M의 ochratoxin A가 결합된다고 보고하였으며, 1 M의 KLH, OVA 및 RSA와 결합하는 ochratoxin A는 각각 19.1 M, 0.3 M 및 1.2 M인 것으로 나타났는데 이러한 결합비는 실험 테크닉, 실험의 반응조건 등에 따라서 조금씩 차이가 있는 것으로 사료된다.

### 2. ELISA법의 확립

합성한 ochratoxin A-BSA conjugate와 Ueno로부터 분양받은 ochratoxin A에 대한 단크론성 항체를 이용하여 Fig. 3과 같이 indirect competitive ELISA법을 확립하였다. 즉, ochratoxin A-BSA를 코팅용 완충용액(carbonate buffer)에 녹여 microtiter plate에 100  $\mu\text{l}$ (100 ng ochratoxin A/well)씩 분주한 다음 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 overnight하여 코팅시킨 후 세척용 완충용액(PBS-tween)으로 4회 세척하였다. 세척 후 항체의 비특이적인 반응을 방지하기 위해 인산 완충용액에 녹인 0.1% ovalbumin을 가하여 overnight시킨 후 세척용 완충용액(PBS-tween)으로 4회 세척하였다. 세척한 plate에 표준 ochratoxin A 또는 분석용 시료 추출액과 ochratoxin A 항체를 희석하여(1:2,000) 각각 50  $\mu\text{l}$ 씩 well에 주입하고 다시 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 하룻밤 반응시켰다. 반응이 끝난 plate를



**Fig. 2.** HPLC chromatogram of ochratoxin A-BSA conjugate. A : Standard, B : Ochratoxin A by hydrolysis OA-BSA, C : A+B mixing.

Coating plates with 100  $\mu$ l of OTA-BSA/coating buffer

↓  
Standing 4°C overnight

↓  
Washing with PBS-Tween (4 times)

↓  
Blocking plates with 125  $\mu$ l of 1% OVA

↓  
Washing with PBS-Tween (4 times)

↓  
Add OTA standard or sample

↓  
Add Ab solution (1 : 2,000 in 1% BSA)

↓  
Incubation (4°C, overnight)

↓  
Washing with PBS-Tween (5 times)

↓  
Add anti-mouse IgG-HRP (1 : 1,000 in 1% BSA-PBS)

↓  
Incubation (1 hr, RT)

↓  
Washing with PBS-Tween (6 times)

↓  
Add substrate solution 100  $\mu$ l (TMBZ)

↓  
Incubation (30 min, RT)

↓  
Add stopping solution (2 N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

↓  
Reading (450 nm)

**Fig. 3.** Procedure of indirect competitive ELISA for ochratoxin A. OVA : ovalbumin, HRP : horse-radish peroxidase, TMBZ : 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine.



**Fig. 4.** Microtiter plate in ELISA of ochratoxin A.

세척용 완충액으로 5회 세척하고, 희석한 2차 항체 (anti-mouse IgG-HRP, 1 : 1,000)를 100  $\mu$ l씩 넣어 실온에서 1시간 반응시킨 후 세척용 완충용액으로 6회 세척하였다. 여기에 기질(TMBZ; 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)을 100  $\mu$ l씩 첨가하여 실온에서 30

분간 반응, 발색시킨 후 2 N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액을 50  $\mu$ l씩 가해 반응을 정지시켰다. 이것을 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하고, 미리 작성해둔 표준곡선에서 ochratoxin A 함량을 계산하였다.

이와 같이 확립된 indirect competitive ELISA 측정조건에 의해 기질의 발색정도는 Fig. 4에서와 같이 ochratoxin A 농도차이에 따라 예민하게 큰 차이를 보였으며 5 ppb부터는 육안적으로도 식별이 가능할 정도로 현저한 O.D.값의 변화를 나타냈다. 이러한 O.D.값의 차이를 ELISA reader로 읽어 표준곡선을 작성한 결과 10 ppb이하의 낮은 농도에서도 강한 O.D. 차이를 보여 2 ppb 정도부터 확실한 분석결과를 얻을 수 있었으며, 이를 토대로 실제 분리균의 ochratoxin A 생성 정도와 곡류중 쌀을 시료로한 ochratoxin A의 오염 정도를 측정하는데 활용하였다.

대체로 mycotoxin의 면역학적 분석을 위해 RIA (radioimmunoassay)가 Aalund와 Dorminique 등<sup>14-16)</sup>에 의해 분석에 응용되었다. 이는 특이한 항체를 solid phase에 고정시킨 후, 방사성 동위원소로 표지된 mycotoxin과 표준 mycotoxin 및 미지 시료를 함께 경쟁적으로 반응시킨 다음 유안침전 등으로 용액속의 복합체를 제거시키고, 상층액속의 표지된 방사성 동위원소량을 측정하여 역으로 mycotoxin의 함량을 계산해내는 방법으로 종래의 방법에 비해 신속, 정확한 장점이 있는 반면 방사성 물질의 안전성, 폐기물의 문제점이 제기되었다. 그후 ELISA법이 고안되어 유리 또는 플라스틱의 solid phase에 coating되어 있는 mycotoxin과 단백질 결합체에 유리 mycotoxin과 1, 2차 항체를 경쟁적으로 작용시키는 indirect competitive ELISA법의 경우 그 과정이 다소 복잡하고 반응시간이 길지만 간편하고 정확한 분석이 가능하게 되었다. 특이성을 갖는 solid phase의 항체결합 부위에 직접 경쟁으로 작용하는 것을 이용하여 간편한 direct competitive ELISA법이 소개되었다.

일반적으로 면역학적 분석법에 의한 mycotoxin 정량은 분석방법과 사용하는 항체의 종류의 특성에 따라 그 감도에 차이가 있지만 대체로 시료 g당 0.2~200 mg 정도이며, 일회용 polystyrene 시험관을 쓰는 micro ELISA나 일회용 플라스틱 microtiter plate(96 well plate)를 쓰는 micro plate ELISA는 오염문제가 많은 식품가공 분야의 분석에도 매우 바람직한 방법으로 생각된다.

### 3. 쌀중 ochratoxin A의 오염

아울러 직접 쌀에 오염된 ochratoxin A의 함량을

**Table 2.** Effect of rice extract on the indirect competitive ELISA for ochratoxin A analysis

Ochratoxin A added (ng/ml)	O.D. (450 nm)	
	10% MeOH in PBS-tween	Rice extract
0	1.144	1.258
0.5	1.026	1.200
1	0.912	1.087
2	0.710	0.959
5	0.426	0.692
10	0.307	0.527
20	0.164	0.359
50	0.068	0.150

**Table 3.** Recovery of ochratoxin A from rice samples after spiking authentic toxin (triplicate runs)

Ochratoxin A added (ng/g rice)	Recovery (%)	C.V.*
60	95	0.22
30	91	0.10
6	94	0.01

\*C.V. : Coefficient of Variance.

**Table 4.** Detection frequency of ochratoxin A in rice by indirect competitive ELISA

Sample No.	Isolated source	Ochratoxin A (ng/g)
R-1	K	6.0
R-9	S	10.0

측정하기 위한 실험을 실시하였다. 쌀에 오염된 ochratoxin A를 ELISA법으로 분석하기 위해서는 먼저 시료의 구성성분 자체가 ELISA에 미치는 영향을 조사하였다. 즉, 쌀 추출액에 ochratoxin A를 주입하여 순수 추출용매에 표준 ochratoxin A를 첨가한 후 비교하면서 확립된 ELISA법을 수행한 결과 Table 2에서와 같이 표준곡선이 약간 달리 나타나므로 쌀 추출물이 ELISA반응에 적게나마 간섭을 하는 것으로 생각되어 본 실험에서는 오염되지 않은 쌀 추출물을 사용하여 표준곡선을 작성한 후 ochratoxin A의 분석시 사용하였다.

또한 본 실험방법에 의해 곡류에 오염되어 있는 ochratoxin A가 분석시 어느정도 회수되는가를 알아보기 위해 쌀 1g에 60, 30 및 6ng에 해당되는 표준 ochratoxin A를 첨가하여 실험방법에 따라 분석하였을 때 회수율은 Table 3에서 보는 바와 같이 91~95% 수준으로 ochratoxin A 분석을 위해

상당히 양호한 회수율을 나타내었다.

이 결과를 토대로 경남지방에서 수거한 42점이 쌀을 수집하여 전처리한 후 확립된 ELISA법으로 ochratoxin A를 분석한 결과는 Table 4에서 보는 바와 같았다. 즉, 수집한 42점의 시료중 2점이 양성으로 나타났으며, 그중 R-1은 6.0 ng/g, R-9는 10 ng/g으로 각각 나타났다.

쌀<sup>17)</sup>도 전통발효식품중에 존재하는 ochratoxin A의 잔류량을 chemilluminescence immunoassay방법을 이용하여 조사한 결과 대체로 실험시료에서의 ochratoxin A의 잔류량은 높은 편으로 2.5 µg/100 g 이상을 기준으로 할 때 메주는 58.3%, 된장 39.4% 그리고 간장에서 10.7%의 오염도를 나타낸다고 보고하였다.

이러한 결과를 미루어 볼때 식품이나 농산물에서의 분석 data가 부족하지만 ochratoxin A의 오염가능성은 충분히 예측할 수 있으며 보다 체계적인 연구를 위한 분석방법의 개선과 monitoring시스템의 확립이 시급한 실정이다.

#### IV. 결 론

식품 및 농산물 중에 ochratoxin A를 분석하기 위한 기존의 방법보다 신속·정확하고 안전한 ELISA방법을 확립하였으며, 이 방법으로 쌀중에 ochratoxin A의 오염여부를 분석하였다. 그 결과는 다음과 같다.

- ① Ochratoxin A에 대한 항원성을 부여하기 위하여 ochratoxin A-BSA를 합성한 결과 BSA 1몰당 ochratoxin A 13몰이 결합된 것으로 확인되었다.
- ② Ochratoxin A 분석을 위해 면역분석법을 응용하고자 ELISA를 확립한 결과 최저 검출한계는 0.5 ppb이었다.
- ③ 1992년 11월부터 12월 사이에 경남지방으로부터 쌀 42점을 수거하여 분석한 결과 2개의 검체(R-1, R-9)에서 ochratoxin A가 검출되었다. 검체 R-1은 6.0 ng/g, 검체 R-9는 10 ng/g으로 검출되었다.

#### 참고문헌

- 1) Boorman, G. : Toxicology and carcinogenesis studies of ochratoxin A in rats (gavage studies). NIH publication No. 88-2813. NIH, Washington, D.C., 1988.
- 2) Kanisawa, M. and Suzuki, S. : Induction of renal

- and hepatic tumors in mice by ochratoxin A. *A mycotoxin, Gann.*, **69**, 599-600, 1978.
- 3) Hald, B. : Human exposure to ochratoxin A, in mycotoxins and phycotoxins '88 (Natori, S., Hashimoto, K. and Ueno, Y., Eds.) Elsevier Science Publications, Amsterdam. 57-65, 1989.
- 4) Krogh, P. : Causal associations of mycotoxic nephropathy. *Acta path. microbiol. scand. Sect. A. Suppl.*, **269**, 28-70, 1978.
- 5) Krogh, P. : Mycotoxic nephropathy. In : Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine. Academic Press, New York, **20**, 147-170, 1976.
- 6) Brodnik, T., Klemenc, N., Vospernik, P. and Zust, J. : Maize contamination by moulds and mycotoxins in SR Slovenia-Yugoslavia. *Krmiva*, **19**, 29-33, 1970.
- 7) Cuturic, S., Pepeljnjak, S. and Cvetnic, Z. : The prevalence of micromyces on cereals and other crops in the vegetation growing in a region of endemic nephropathy in middle posavina. *Lij. vjesnik*, **101**, 525-530, 1979.
- 8) Hult, K., Hokby, E., Gatenbeck, S., Plestina, R. and Ceovic, S. : Ochratoxin A and Balkan endemic nephropathy IV. IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, Lausanne, 1979.
- 9) Breitholtz-Emanuelsson, A., Dalhammer, G. and Hult, K. : Immunoassay of ochratoxin A, using antibodies developed against a new ochratoxin-albumin conjugate. *J. AOAC.*, **75**(5), 1992.
- 10) Chiba, J., Kajiji, H., Kawamura, O., Ohi, K., Morooka, N. and Ueno, Y. : Production of monoclonal antibodies reactive with ochratoxin A: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for detection of ochratoxin A. *Proceedings of Japanese Association of Mycotoxicology* **21**, 28-29, 1985.
- 11) Czerkinsky, C., Nilsson, L. A. and Nygren, H. : A solid-phase enzyme linked immunosorbent assay for enumeration of specific antibody secreting cells. *J. of Immunol. Methods*, **65**, 109-121, 1983.
- 12) Kawamura, O., Sato, S., Kajiji, H., Nagayama, S., Ohtani, K., Chiba, J. and Ueno, Y. : A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay of ochratoxin A based on monoclonal antibodies. *Toxicol.*, **27**, 887-897, 1989.
- 13) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275, 1951.
- 14) Aalund, O., Brunfeldt, K., Holand, B., Krogh, P. and Pouksen, K. : A radioimmunoassay for och-

- ratoxin A : a preliminary investigation. *Acta Pathologica Scandinavica, Section C.*, **83**, 390-392, 1975.
- 15) Dorminique, M. R., Slegers, G. A. and Van Peteghem, C. H. : Radio immunoassay of ochratoxin A in barley. *J. Appl. Env. Microbiol.*, **50**, 529-531, 1985.
- 16) Rousseau, D. M., Slegers, G. A. and Peteghem, C. H. V. : Radio immunoassay of ochratoxin A in barley. *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 529-531, 1985.
- 17) Kang, S. C. : Studies on condition of production, isolation and identification of the fungi and analysis of present ochratoxin A in Korea traditional fermented foodstuffs. 건국대학교 석사학위논문, 1991.