

추출물의 희석에 의한 옥수수 중 Fumonisins의 효소면역측정법

손동화 · 김영목
한국식품개발연구원

An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Fumonisins in Corn without Cleanup Procedure

Dong-Hwa Shon and Young-Mok Kim
Korea Food Research Institute

Abstract

A simple and rapid ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) system for fumonisins, a group of potent carcinogen, was developed. To produce anti-fumonisin B1 (FB1) antibodies, FB1 conjugated to keyhole limpet hemocyanin (KLH) and Freund's adjuvant were immunized into rabbits subcutaneously 3 times. From one of the antisera showing high titer and good competition with the toxin in ELISA, polyclonal antibodies were purified. The cross-reactivities of the antibodies against fumonisins B₁, B₂, and B₃ were 100%, 69%, and 166%, respectively. When competitive direct ELISA established by use of the antibody was applied to the spike test of FB₁ onto uncontaminated corns, the assay recovery was unstable unless 75% methanol extracts of corn were diluted to 1/100 with buffer. In that condition the mean ELISA recovery of FB₁ from corns spiked 1-30 µg/g was 67% and stable (coefficient of variation (CV) of each recovery percentage, 3.4%). The results suggest that the ELISA system established in this study needs no cleanup procedure and therefore would be powerful to screen a large number of corn samples contaminated with fumonisins.

Key words: fumonisins, ELISA, corn

서 론

사람의 식도암 및 말의 뇌백연화증 (equine leukoencephalomalacia, ELEM)을 유발하는 곰팡이독소로 알려져 있는 fumonisin^(1,2)은 *Fusarium moniliforme*에 의하여 생성되며, 옥수수, 밀, 보리 등의 작물에 주로 오염되어 있다⁽³⁾.

자연발생되는 fumonisin의 유도체는 B₁, B₂, 및 B₃ (FB₁, FB₂, FB₃)이며, 그 중에서도 FB₁ (분자량, 721.8)은 오염 빈도가 높으며 독성도 가장 강한 것으로 보고되고 있다⁽⁵⁾.

각국으로부터 수집한 옥수수 함유 식품에서 모두 FB₁이 발견되었으며, 미국서 구입한 식품에서도 비교적 높은 농도의 FB₁ 오염(최고 2.8 ppm)이 보고되었다⁽⁶⁾. 수입 옥수수를 원료로 한 국내사료 중 77%가 오염되었으며 그 범위는 50-1,281 ppb로 나타났다⁽⁷⁾. 또한, 원료

옥수수를 대상으로 조사한 바에 의하면, 미국 중서부에서 1988-1991년에 생산한 옥수수의 50%가 FB₁에 오염되었으며 10%는 오염범위가 10-50 ppm이었고⁽⁸⁾, 국내에서 1992년에 수확한 옥수수의 47%가 오염되었으며 그 범위는 51-6,455 ppb이었다⁽⁹⁾.

본 연구에서는 옥수수 등 농산물에 오염 가능성이 높은 발암성 진균 독소 fumonisin을 효율적으로 검출할 수 있는 효소면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)을 개발하고자 하였다. 즉, ELISA 분석시 추출물 중의 방해물질을 제거하기 위한 정제과정 (cleanup)은 많은 수의 시료를 분석하는 경우 분석의 효율성을 낮추기 때문에⁽¹⁰⁾, 이에 대한 대안으로서 추출물을 희석함으로써 분석이 가능한 ELISA system을 개발하였다.

재료 및 방법

재료

FB₁, FB₂ 표준독소 및 keyhole limpet hemocyanin

Corresponding author: Dong-Hwa Shon, Food Chemistry & Physics Division, Korea Food Research Institute, San 46-1, Baekhyun-dong, Bundang-ku, Songnam, Kyunggi-do 463-420, Korea

(KLH), Tween 20, 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazolinesulfonic acid) (ABTS), sodium borohydride, glutaraldehyde, goat anti-rabbit IgG-HRP conjugate 등은 Sigma사의 제품을 이용하였고 Freund's adjuvant (complete/incomplete), periodate activated HRP (horse raddish peroxidase), 단백질 정량용 micro BCA kit (#23235), 항체정제용 protein A column (ImmunoPure Plus IgG Purification Kit, #44679)은 Pierce사로부터 구입하였으며, 기타의 시약과 유기용매는 GR급이나 그 이상을 사용하였다. FB₁는 Cawood 등⁽¹¹⁾의 방법에 의하여 FB₁를 정제하는 과정에서 얻어지는 부산물을 정제하여 사용하였다. Microtiter plate는 Nunc사의 Maxisorp을, microplate reader는 Bio-Tek사의 EL 307C를 사용하였다.

면역원의 제조

Usleber 등⁽¹²⁾의 방법을 참고하여 면역원인 FB₁-KLH 결합체를 제조하였다. 0.01 M phosphate buffered saline (PBS; 1.9 mM Na₂HPO₄, 8.1 mM Na₂HPO₄, 154 mM NaCl, pH 7.4)에 대하여 투석한 KLH, 6.7 mg과 FB₁ 2 mg을 완충액에 혼합 용해한 액 1.2 ml를 준비하고 여기에 1%의 glutaraldehyde (v/v)를 28 μl 점滴하여 첨가하고 상온에서 3시간 교반하였다. 반응이 끝난 다음 PBS에 대하여 투석하고 FB₁-KLH를 얻었으며 이를 냉장보관하면서 면역에 사용하였다. 단백질 농도는 BCA kit를 이용하여 구하였다.

FB₁-HRP 결합체의 제조

경합 ELISA에 사용하기 위한 FB₁-HRP 결합체를 다음과 같이 준비하였다. Imagawa 등⁽¹³⁾의 방법을 참조하여 0.4 mg의 FB₁과 1 mg의 periodate activated HRP를 0.5 ml의 PBS (pH 7.4)에 용해하여 상온에서 1시간 반응시킨 다음, 여기에 10 μl의 환원제(5 M sodium borohydride in 1 M NaOH)를 첨가하여 상온에서 15분간 반응시키고, 이어서 20 μl의 quenching buffer (3 M의 ethanalamine, pH 9.0)를 첨가하여 다시 상온에서 15분간 처리하였다. 반응이 끝난 용액을 PBS에 투석하여 회수하였다.

특이항체의 생산

FB₁-KLH 결합체를 멸균한 PBS에 용해시켜 Freund's complete adjuvant와 함께 동량비로 유택액을 만들어, 채중 2.5 kg가량의 New Zealand White 암토끼 3마리의 뒷발바닥에 마리당 100 μg씩 피하주사하였다. 첫 면역 3, 5주 후에는 FB₁-KLH를 Freund's incomplete

adjuvant와 동량비로 유택액을 만들어 각각 100 μg씩 토끼의 등에 피하주사로 면역하였다. 면역 일 주일 후 토끼 귀의 정맥으로부터 마리당 50 ml 가량씩 채혈하였다. 채혈 후 3시간 가량 실온에서 방치하여 혈액을 응고시킨 후, 원심분리하여 항혈청을 분리하였다. 항체의 정제를 위하여 protein A column을 이용하였다.

효소면역측정법 (ELISA)

Fumonisins의 측정을 위하여 확립한 직접법에 의한 경합 ELISA (competitive direct ELISA; cdELISA)의 조건은 다음과 같다. 항체를 coating buffer (0.02 M Tris, 0.15 M NaCl, pH 9.0)에 10 μg/ml로 희석한 액 100 μl를 well에 채우고 4°C에서 하룻밤 방치하여 coating한 후, wash buffer (수세용 완충액; 0.02 M Tris, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.4) 150 μl로 3회 세척하였다. 이어서, 앞의 FB₁-HRP를 수세용 완충액에 1/100로 희석한 것과 fumonisin 용액을 1 : 1로 혼합 후 각 well에 100 μl씩 넣고 상온에서 한 시간 처리하였다. 수세용 완충액으로 3회 세척한 후 기질 용액 (0.1% ABTS, 0.06 M citric acid, 0.077 M Na₂HPO₄, pH 4.0, 0.02% hydrogen peroxide 사용전 첨가) 100 μl를 넣고 상온에서 30분간 방치하여 발색시킨 다음 반응정지액(0.01% sodium azide) 100 μl를 첨가하였다. Microplate reader로 파장 405 nm에서 각 well의 흡광도를 측정하였다. 각 시료당 3개씩의 well을 사용하여 얻은 흡광도의 평균값으로 분석하였다.

항FB₁ 항혈청의 교차반응

항체의 특이성을 조사하기 위하여 유사독소에 대한 항FB₁ 항혈청의 교차반응(cross-reactivity)을 cdELISA로 분석하였다. 즉, 각각 수세용 완충액에 농도별로 희석한 유사독소(FB₁, FB₂)를 FB₁ 대신에 사용하여 ELISA를 행하였다. 교차반응의 정도는 항FB₁ 항체에 대한 FB₁-HRP의 결합을 50% 저해하는 FB₁의 농도를, FB₁-HRP의 결합을 50% 저해하는 유사독소의 농도로 나눈 %값으로 나타내었다.

인위적으로 오염시킨 FB₁의 회수율 분석

곡물중 FB₁의 오염치 분석을 위해 fumonisin이 가장 흔하게 오염되는 것으로 보고되고 있는 옥수수를 실험의 시료로 사용하였다. 오염되지 않은 분쇄시료 10 g에, acetonitrile에 녹인 FB₁를 일정량 첨가하고 상온에서 하룻밤 방치한 후 이를 삼각flask에 넣고 75%의 methanol로 30분간 진탕, 추출하여 cdELISA로 회수율을 분석하였다(spike test). 추출물은 필요에 따라 수세

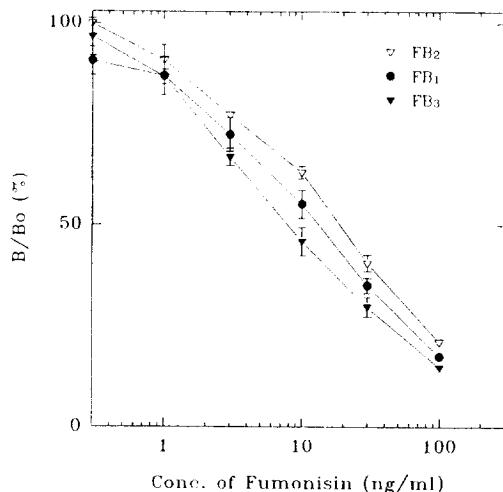


Fig. 1. Reactivity of specific antibody towards fumonisins as determined by cdELISA

용 완충액으로 적량배율 회석하여 ELISA분석에 사용하였다. 이때 검정곡선(standard curve)의 작성을 위한 FB_1 용액은 완충액, 또는 완충액으로 회석한 75% methanol 및 오염되지 않은 옥수수 추출물에 농도별로 준비하여 사용하였다.

결과 및 고찰

항체의 특성 및 교차반응

FB_1 -KLH로 면역한 세 마리의 토끼에서 얻은 항혈청에 대하여 비경합적 ELISA를 행한 결과, 모든 토끼에서 FB_1 에 대해 특이적으로 결합하는 항 FB_1 IgG 항체가 생성되었음을 확인할 수 있었다. 이중 1/2,000로 회석한 3차 항혈청을 사용한 cdELISA로 FB_1 에 대한 경합의 정도를 조사한 결과, 동일한 조건에서 3번 항혈청의 항 FB_1 IgG 항체가 가장 경합이 잘 일어났으며, 발색치도 가장 높았다(data 생략). 따라서 이 후의 실험에서는 이 항혈청을 사용하였다.

cdELISA로 독소를 분석하는 경우에는 먼저 microplate에 항체를 coating하게 되는데 이 경우에 항혈청보다 정제된 항체가 효과적이다(미발표 자료). 따라서 항혈청으로부터 protein A column을 이용하여 항체를 분리, 정제하여 사용하였으며, 정제된 항체의 농도는 3.1 mg/ml이었다.

정제된 항체의 교차반응을 cdELISA로 조사하였다. 즉, FB_1 의 유도체 중 자연발생이 되는 것으로 보고되고 있는 FB_2 와 FB_3 에 대한 교차반응을 알아보았다. 그 결과 Fig. 1에 나타난 바와 같이 이 항체의 FB_1 -HRP에

Table 1. Cross-reactivity of FB_1 and its derivatives with anti- FB_1 antibody as determined by cdELISA

Toxin	Toxin displacing 50% of FB_1 -HRP, ng/ml	Cross-reactivity ^{b)} %
FB_1	12.6	100.0
FB_2	18.2	69.2
FB_3	7.6	165.8

^{b)} $\frac{\text{Conc. of } FB_1 \text{ displacing 50\% of } FB_1\text{-HRP}}{\text{Conc. of toxin displacing 50\% of } FB_1\text{-HRP}} \times 100$

대한 결합을 50% 저해하는 FB_1 , FB_2 , FB_3 의 농도는 12.6, 18.2, 7.6 ng/ml이었다. 이로부터 구한 항체의 FB_1 , FB_2 및 FB_3 에 대한 교차반응율은 각각 100, 69.2, 166%이었다(Table 1).

FB_1 추출물의 회석에 따른 ELISA 회수율

앞에서 얻은 항체를 이용한 cdELISA로 옥수수 시료 중 fumonisin 분석의 가능성을 조사하기 위하여 예비적인 spike test를 행하였다. 즉, HPLC로 분석했을 때 FB_1 에 오염되지 않은 것으로 판단된 분쇄 옥수수에 인위적으로 FB_1 을 일정 농도로 오염시킨 뒤 5배(v/w)의 75% methanol로 추출 후, 여과한 다음 수세용 완충액으로 적당배율 회석하여 cdELISA에 의한 분석회수율을 구하였다. 이는 추출용매로 methanol이 acetonitrile보다 양호하였으며, 완충액으로 회석하지 않은 추출물에 대하여 ELISA를 행한 경우 회수율이 매우 불량하였기 때문이었다(data 생략).

추출물을 1/10로 회석시의 회수율 : 추출물의 회석 정도에 따른 회수율을 검토하기 위하여, 우선 추출물을 수세용 완충액으로 1/10 회석한 경우 cdELISA를 행하여 얻은 흡광치를 세 종류의 검정곡선에 견주어 회수율을 구하였다. 검정곡선(standard curve)의 작성을 위한 표준독소 용액은 수세용 완충액, 75% MeOH를 수세용 완충액으로 1/10 회석한 것, 그리고 오염되지 않은 옥수수의 75% MeOH 추출물을 다시 수세용 완충액으로 1/10 회석한 것에, 각각 농도별로 용해한 독소를 사용하였다. 이때 ELISA로 얻은 검정곡선은 Fig. 2와 같으며, 각각의 검정곡선을 기준으로 하여 구한 회수율은 Table 2에 나타난 바와 같이 세 경우에서 모두 1,000 및 10,000 ng/g 오염 시료에서 37-40%로 낮지만 비교적 안정되게 보였으나, 100 ng/g의 저농도 오염 시료의 경우는 분석회수율이 이보다 높거나 불가능한 것으로 나타났다. 이는 옥수수 추출물 중 방해물이 여전히 작용하기 때문인 것으로 생각되어, 그 작용을 더욱 낮출 수 있는 회석배율(1/100)을 이어서 검토하였다.

추출물을 1/100로 회석시의 회수율 : FB_1 을 인위적

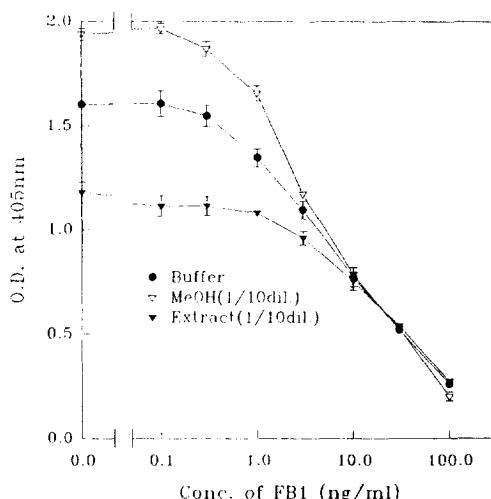


Fig. 2. Dilution effect of MeOH and corn extract with buffer on cdELISA standard curve Standard FB₁ was dissolved in wash buffer, 75% MeOH, and corn extract of 75% MeOH which were diluted to 1/10 with wash buffer

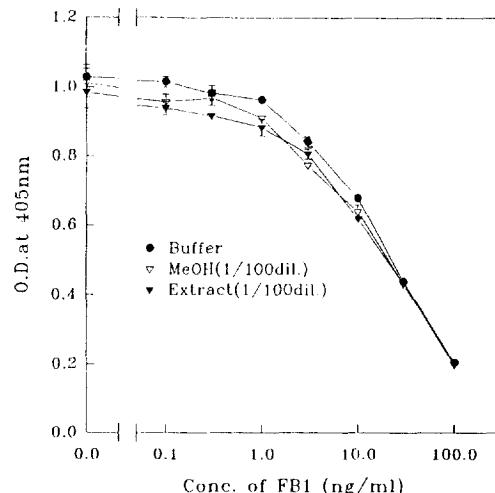


Fig. 3. Dilution effect of MeOH and corn extract with buffer on cdELISA standard curve Standard FB₁ was dissolved in wash buffer, 75% MeOH, and corn extract of 75% MeOH which were diluted to 1/100 with wash buffer

Table 2. Recovery of FB₁ from spiked corns after 75% MeOH extraction and subsequent dilution to 1/10 with wash buffer as determined by cdELISA

Added (ng/g)	Detected, ng/g (Recovery, %)		
	Buffer ¹⁾	MeOH (1/10 dil) ¹⁾	Extract (1/10 dil) ¹⁾
100	104 (104)	147 (147)	ND ²⁾
1,000	353 (35.3)	383 (38.3)	284 (28.4)
10,000	4,528 (45.3)	3,550 (35.5)	4,650 (46.5)
Overall recovery, %	61.5 [40.3] ³⁾	73.8 [36.9] ³⁾	[37.5] ³⁾
SD ⁴⁾	37.1 [7.1] ³⁾	63.9 [2.0] ³⁾	[12.8] ³⁾
CV ⁵⁾ , %	60.3 [17.6] ³⁾	86.6 [5.4] ³⁾	[34.1] ³⁾

¹⁾For calibration curve of ELISA, standard FB₁ was dissolved in the soln; The concentration of diluted extracts were determined with reference to each calibration curve (Fig. 2)

²⁾Not determinable

³⁾Calculated between 1,000 and 10,000 ng/g

⁴⁾Standard deviation

⁵⁾Coefficient of variation

Table 3. Recovery of FB₁ from spiked corns after 75% MeOH extraction and subsequent dilution to 1/100 with wash buffer as determined by cdELISA

Added (ng/g)	Detected, ng/g (Recovery, %)		
	Buffer ¹⁾	MeOH (1/100 dil) ¹⁾	Extract (1/100 dil) ¹⁾
100	70.8 (70.8)	ND ²⁾	ND ²⁾
1,000	552 (55.2)	222 (22.2)	31.7 (3.2)
10,000	8,213 (82.1)	6,735 (67.4)	6,472 (64.7)
Overall recovery, %	69.4 [68.7] ³⁾	[44.8] ³⁾	[34.0] ³⁾
SD ⁴⁾	13.5 [19.0] ³⁾	[32.0] ³⁾	[43.5] ³⁾
CV ⁵⁾ , %	19.5 [27.7] ³⁾	[72.7] ³⁾	[127.9] ³⁾

¹⁾For calibration curve of ELISA, standard FB₁ was dissolved in the soln; The concentration of diluted extracts were determined with reference to each calibration curve (Fig. 3)

²⁾Not determinable

³⁾Calculated between 1,000 and 10,000 ng/g

⁴⁾Standard deviation

⁵⁾Coefficient of variation

으로 오염시킨 옥수수의 추출물을 수세용 완충액으로 1/100 회석하여 cdELISA를 행하여 얻은 흡광치를 위의 세 종류의 검정곡선에 견주어 회수율을 구하였다. 각각 농도별로 용해한 표준독소를 이용하여 구한 ELISA의 검정곡선으로 분석치를 구하였다(Fig. 3). 그 결과 Table 3에 나타난 바와 같이 methanol 검정곡선 및 추출물 검정곡선을 기준으로 구한 1,000 및 10,000 ng/g

으로 오염 시료의 분석치는 매우 불안정하게 나타났으며, 특히 100 ng/g 오염 시료의 경우는 발색치가 너무 높아 측정이 불가능하였다. 반면에 buffer 검정곡선을 기준으로 구한 각 농도별 분석치의 회수율은 상기의 어느 경우보다 비교적 안정되고 높은 평균회수율(69.4%)을 보임으로써 추출물을 정제하지 않고 분석할 수 있음을 보였다. 한편, 추출물을 1/30 또는 1/60로 회석한 경우

Table 4. Recovery of FB₁ from spiked corns as determined by cdELISA

Added, ng/g	Detected, ng/g ¹⁾	Recovery, %
300	342.3 ± 70.9 (20.7)	114.1
1,000	667.3 ± 59.0 (8.8)	66.8
3,000	2,105.1 ± 266.0 (12.6)	70.2
10,000	6,541.0 ± 1.3 (0.02)	65.4
30,000	19,610.1 ± 622.0 (3.2)	65.4
Mean of CV, %	9.1 [6.2] ²⁾	
Overall recovery, %	76.4 [66.9] ²⁾	
SD	21.2 [2.3] ²⁾	
Mean CV	27.8 [3.4] ²⁾	

¹⁾Mean of interassay ($n=2$) ± SD (CV, %); The concentration of extract diluted to 1/100 with wash buffer were determined with reference to the standard curve

²⁾Calculated between 1,000 and 30,000 ng/g

에는 1/100로 희석한 위의 경우보다 분석회수율이 불안정하여 대체로 열등하였다(data 생략).

따라서, 다음으로는 인위적인 FB₁의 오염범위를 300-30,000 ng/g으로 확대하고, 추출물을 수세용 완충액으로 1/100 희석한 후 완충액에 용해한 표준독소로 구한 검정곡선을 이용하여 ELISA분석의 회수율을 검토하였다. 그 결과, 각 오염 농도별 분석치는 Table 4에 나타난 바와 같이 대체로 양호한 평균 76.4%의 회수율을 보였으며, 1,000 ng/g 이상의 오염시료의 분석에서는 평균 회수율이 67%로 매우 안정되게 나타났다(농도별 회수율의 변이계수 (CV), 3.4%).

한편, FB₁-cholera toxin에 대하여 유기한 항체를 이용한 ELISA의 경우⁽¹⁰⁾ 불순물을 제거한 옥수수 추출물의 분석 회수율이 34%, 검출감도가 3,000 ng/g이었던 점에 비하여 본 분석방법은 상당히 개선되었음을 알 수 있다. 하지만 Usleber 등⁽¹²⁾이 확립한 ELISA의 경우 회수율이 60-73%, 검출감도가 50 ng/g이었던 점에 비하면, 본 분석법의 검출감도를 높이는 시도가 필요하다고 생각한다.

결론적으로 fumonisin은 다른 진균 독소와는 달리 곡물 추출물을 직접 ELISA로 분석하기가 용이하지 않았으나, 추출물을 희석함으로써 정제과정없이 분석이 가능한 ELISA system을 개발하였다. 그러므로 본 연구에서 확립한 fumonisin의 분석 system은 실제로 많은 수의 옥수수 시료 중 1 ppm 이상의 fumonisin 오염 시료를 한꺼번에 손쉽게 일차로 분석하는데 매우 유용하게 활용가능할 것으로 생각된다.

요 약

발암성 진균 독소의 하나인 fumonisin을 신속, 간편

하게 분석할 수 있는 효소면역측정법 (ELISA)을 개발하고자 하였다. 먼저 Fumonisin B₁ (FB₁)에 특이적인 항체를 생산하기 위하여 FB₁을 keyhole limpet hemocyanin (KLH)에 공유결합시키고 이를 Freund's adjuvant와 함께 토끼에 3차례 피하주사하여 면역하였다. 높은 항체가와 가장 양호한 경합반응을 보인 항혈청으로부터 항체를 정제하였으며, 이 항체의 fumonisin 유사독소에 대한 고차반응은 fumonisin B₁, B₂ 및 B₃에 대하여 각각 100%, 69% 및 166%이었다. FB₁의 검출을 위하여 확립한 직접법 경합ELISA (cdELISA)로 옥수수에 인위적으로 오염시킨 FB₁을 정제없이 ELISA로 분석하는 경우, 75% methanol로 시료의 추출 후 완충액으로 1/100 희석하였을 때 양호한 회수율을 보였다. 이 조건 하에서 행한 ELISA의 FB₁분석회수율은 1-30 µg/g의 오염농도범위에서 평균 67%이었으며, 농도별 회수율의 분산은 3.4%로 분석치가 매우 안정하였다. 본 연구에서 개발한 fumonisin 분석용 ELISA system은 수입 및 국내산 농산물로부터 이 독소의 정제없이 손쉽게 다양한 시료를 일차로 분석하는데 유용할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 1995년 보건복지부의 보건의료기술연구개발사업으로 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

문 현

- Bezuidenhout, S.C., Gelderblom, W.C.A., Gorst-Allman, C.P., Horak, R.M., Marasas, W.F.O., Spiteller, G. and Vleggaar, R.: Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1988**, 743 (1988)
- Gelderblom, W.C.A., Jaskiewicz, K., Marasas, W.F.O., Thiel, P.G., Horak, R.M., Liggaaar, R.V. and Kriek, N.P. J.: Fumonisin-Novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1806 (1988)
- Marasas, W.F.O., Wehner, F.C., van Rensburg, S.J., and Van Schalkwyk, D.J.: Mycoflora of corn produced in human esophageal cancer areas in Trankei, southern Africa. *Phytopathol.* **71**, 792 (1981)
- Anderegg, J. and Guthrie, J.W.: Seedborne *Fusarium moniliforme* and seedling infection in hybrid sweet corn. *Phytopathol.* **71**, 1196 (1981)
- Sydenham, E.W., Shephard, G.S. and Thiel, P.G.: Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁, B₂, and B₃ in foods and feeds. *J. AOAC Int.* **75**, 313 (1992)

6. Sydenham, E.W., Shephard, G.S., Tiel, P.G., Marasas, W.F.O. and Stockenstrom, S.: Fumonisin contamination of commercial corn-based human foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.* **39**, 2014 (1991)
7. 이택수, 정수현, 김영배 : 옥수수를 주재료로 한 한국산 사료에서의 fumonisin B₁의 오염현황. *한국식품과학회지*, **27**, 221 (1995)
8. Murphy, P.A., Rice, L.G. and Ross, P.F.: Fumonisin B₁, B₂ and B₃ content of Iowa, Wisconsin, and Illinois corn and corn screening. *J. Agric. Food Chem.* **41**, 263 (1993)
9. Chung, S.H. and Kim, Y.B.: Natural occurrence of fumonisin B₁ in Korean corn and rough rice. *Foods and Biotechnol.* **4**, 212 (1995)
10. 손동화, 한성민, 임선희, 이인원, 조선희, 강신영, 이경애 : 효소면역측정법을 이용한 fumonisin의 검출법 개발. *한국산업미생물학회지*, **24**, 119 (1996)
11. Cawood, M.E., Gelderblom, W.C.A., Vleggaar, R., Behrend, Y., Thiel, P.G. and Marasas, W.F.O.: Isolation of the fumonisin mycotoxins: a quantitative approach. *J. Agric. Food Chem.* **39**, 1958 (1991)
12. Usleber, E., Straka, M. and Terplan, G.: Enzyme immunoassay for fumonisin B₁ applied to corn-based food. *J. Agric. Food Chem.* **42**, 1392 (1994)
13. Imagawa, M., Yoshitake, S., Hamaguchi, Y., Ishikawa, E., Niitsu, Y., Urushizaki, I., Kanazawa, R., Tachibana, S., Takazawa, N. and Ogawa, H.: Characteristics and evaluation of antibody-horse radish peroxidase conjugates prepared by using a maleimide compound, glutaraldehyde, and periodate. *J. Appl. Biochem.* **4**, 41 (1982)

(1996년 6월 25일 접수)