

판토텐산의 분석을 위한 효소면역측정법

손동화 · 박윤식 · 배근원
한국식품개발연구원

An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Pantothenic Acid

Dong-Hwa Shon, Youn-Sick Park and Gun-Won Bae
Korea Food Research Institute

Abstract

In order to detect pantothenic acid (PA), conditions for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were established. Anti-PA-BSA antibody was produced from rabbits immunized with PA-bovine serum albumin (BSA) conjugates which were prepared by the bromoacetyl chloride [Bc] method (PA-BSA[Bc]) and by the periodate oxidation [Po] method (PA-BSA[Po]). PA-BSA[Bc] and PA-BSA[Po] was used as a coating antigen for competitive indirect(c)ELISA. The Anti-PA-BSA[Po] antibody on ciELISA showed no competitive reaction. The detection limit of PA by ciELISA using Anti-PA-BSA[Bc] antibody was 1 ppm. The Anti-PA-BSA[Bc] antibody showed little cross-reactivity to PA derivatives such as pantoyllactone, pantetheine, pantothenyl alcohol, and acetyl CoA. The detection limit of PA by microbiological assay (MBA) was 10 ppb. Assay recoveries of PA in egg, cow's liver, and lettuce by ciELISA were 109, 64, and 344%, respectively, comparing with the MBA results.

Key words : pantothenic acid, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), microbiological assay (MBA)

서 론

비타민은 생물체내에서 에너지원이거나 신체구성물질이 아니지만, 미량으로 존재하면서 호르몬, 효소, 아미노산등과 밀접한 연관되어 있을 만큼 사람이나 동물의 여러 가지 생리기능을 조절하며 완전한 물질 대사가 일어날 수 있도록 하는 유기화합물로서 필수 불가결한 영양소이다. 비타민이 발견된 1991년 이후부터 현재까지 약 30여종의 비타민이 발견되었다. 수용성 비타민의 하나인 pantothenic acid(PA)는 식품 내에서 free form이나 coenzyme A 또는 protein derivative의 형태로 존재하며, 지방산 산화, 지방산 합성, steroid합성, 피루브산 산화, 아미노산 대사 등의 효소반응에 있어서 acetyl기를 전이시키는 CoA의 전구체 역할을 하는 것으로 알려져 있다⁽¹⁾.

대부분의 식품 중에 포함되어 있는 비타민은 함량에 대한 정확한 정보가 적고 식품성분표에도 항목이 나타나 있지 않기 때문에 영양학적인 측면이나 임상적인 연구가 미흡한 실정이다. 그리고, 경제수준의 향상과 더불어 국내 식생활의 개선과 향상으로 식품 중에 함유되어있는 비타민을 빠르고 특이적으로 검사할 수 있는 방법의 필요성이 대두되고 있다. 또한, 비타민은 식품에 워낙 미량으로 존재하는 것이 많을 뿐만 아니라 불안정한 편이어서 식품의 가공 및 저장 중에 상당히 감소되기 때문에 종래의 분석법(bioassay)으로는 검출감도가 낮거나 까다로운 전처리 및 고도의 분석기술을 요하며 많은 시간을 필요로 한다.

PA를 분석하기 위한 기존의 분석법 즉, *Lactobacillus plantarum*을 이용한 미생물 분석법(microbiological assay; MBA)은 검출시간까지 많은 시간이 소모되는 단점이 있으며, radioimmunoassay의 경우는 특이성, 감도 면에서 좋은 결과를 보이는 것이 보고된 바가 있으나 방사능 물질을 사용해야 한다는 단점이 있다^(2,3). 또한, HPLC의 경우에는 일반적으로 복잡한 전처리 과정을 필요로 하며, 한번에 다량의 시료를 분석하지 못하

Corresponding author : Dong-Hwa Shon, Korea Food Research Institute, San 46-1, Backhyun-dong, Bundang-Gu, Songnam, 463-420, Korea
Tel : 82-31-780-9133
Fax : 82-31-780-9265
E-mail : dhs95@kfri.re.kr

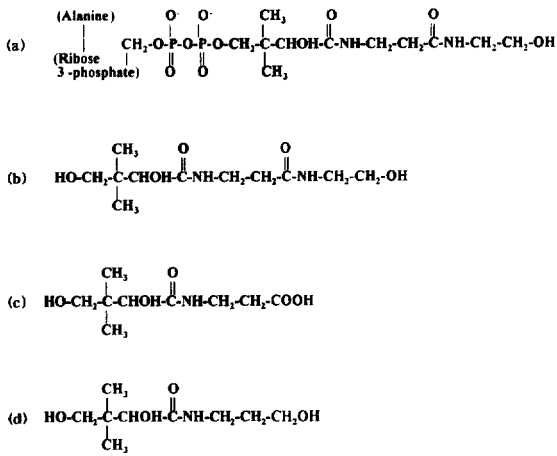


Fig. 1. Structures of (a) Co-enzyme A, (b) pantotheine, (c) pantothenic acid, and (d) pantothenol (panthenol or pantothenyl alcohol).

는 단점을 가지고 있다⁽⁴⁾. 그리고, 식품 중에 PA와 유사한 구조를 가진 PA유도체가 혼합되어 있을 경우 교차반응에 문제점이 있었기 때문이다 (Fig. 1).

현재까지 국내에서는 aflatoxin B₁⁽⁵⁾과 같은 곰팡이 독소나 항생물질을 검출하기 위하여 ELISA를 개발하고 적용한 보고는 다수 있었으나, 식품 중에 존재하는 비타민을 분석하기 위해 ELISA를 활용한 예는 biotin⁽⁶⁾ 이외에는 거의 없었다. 이에 본 연구에서는 기존 검출법에서 나타난 단점을 보완하고 식품 중에 있는 PA를 검출하기 위하여 효소면역측정법(ELISA)을 개발하고 이를 식품분석에 적용하고자 하였다.

재료 및 방법

PA-BSA conjugate의 제조

PA-BSA conjugate를 면역원으로 사용하기 위하여 bromoacetyl chloride [Bc] method⁽⁷⁾와 일부 수정한 periodate oxidation [Po] method⁽⁸⁾의 두 가지 방법으로 bovine serum albumin(BSA)에 conjugation하여 PA-BSA conjugate를 제작하였다.

Bromoacetyl chloride 방법을 이용한 PA-BSA conjugate(PA-BSA[Bc])는 다음과 같은 방법으로 제조하였다. 25 mL의 0.17 M PA · ½Ca에 0.5 M citric acid를 첨가하여 pH 2.7로 맞추고, 같은 부피의 ethylacetate로 3번 추출한 후 ethylacetate를 증발시키고 나서 anhydrous sodium sulfate로 24시간 동안 건조하였다. 여기에 300 mg의 MgCO₃ · 5H₂O와 200 µL의 bromoacetyl chloride이 포함되어 있는 ethylacetate를

5 mL 첨가하여 4°C에서 5분 동안 반응시킨 후 2 mL의 0.5 M phosphate buffer(pH 7.8)를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 원심분리한 후 상등액을 농축하기 위해서 감압농축기를 사용하였으며, 동시에 ethylacetate를 제거하였다. 한편, 20 mg BSA를 1 mM Na₂EDTA와 8 M urea가 녹아있는 50 mM phosphate buffer(pH 8.0) 10 mL에 첨가하여 30분 동안 변성시켰다. 여기에 1 mM EDTA와 11 mg의 dithiothreitol를 첨가하여 30분 동안 반응시킴으로써 BSA의 S-S결합을 -SH기로 환원시켰다. -SH기로 환원된 BSA와 위에서 제조한 bromoacetyl pantothenic acid를 혼합한 용액에 0.2 M sodium phosphate 용액을 첨가하여 pH 7.3으로 맞추고 24시간 동안 암실에서 반응시켰다. 그런 다음 0.5 M phosphate buffer(pH 7.4)에 투석하여 PA-BSA[Bc]를 만들었다.

Periodate oxidation 방법을 이용한 PA-BSA conjugate (PA-BSA[Po])는 다음과 같은 방법으로 제조하였다. 위 방법과 같이 건조된 PA를 3 mL의 증류수(580 mM PA)에 녹여서 0.1 N NaOH로 pH 8.5로 맞추고 200 µL의 23.5 mM glycidol를 첨가한 후 24시간 동안 방치하여, PA의 primary alcohol group이 hydroxyl기로 생성되게 하였다. 이후 128.4 mg의 NaIO₄를 처리하여 aldehyde 기로 전환시킨 후 300 µL의 5 M NaCNBH₃의 존재 하에서 10 mg BSA의 amino기와 반응시킴으로써 PA-BSA[Po]를 만들었다.

이와 같은 방법으로 만든 PA-BSA conjugate를 phosphate buffer saline(pH 7.4)에 투석하였고, centrifuge filter units(Biomax-10K membrane; Sigma)를 이용하여 1 mg/mL로 농축하여 면역원으로 사용하였다.

항체의 생산과 정제

PA에 특이적으로 결합하는 항체를 생산하기 위하여⁽⁹⁾ 면역원으로 준비한 PA-BSA conjugate(PA-BSA [Bc])와 Freund's complete adjuvant를 동량비로 혼합하여 유탁액을 만든 후, 체중 2~3 kg가량의 흰토끼(New Zealand White 종) 2마리의 뒷 발바닥에 각각 1 mL (0.5 mg/mL)씩 주사하였다. 이후 추가면역을 위해 Freund's incomplete adjuvant를 사용하여 면역원과 동일한 방법으로 유탁액을 만든 후 2주 간격으로 피하 주사하였다.

면역한 후 1주일 뒤에 토끼의 귀정맥으로부터 채혈하여 3시간 가량 실온에서 방치하여 혈액을 응고시킨 후 약 2시간동안 냉장보관한 다음, 원심분리(3,000×g, 10분)하여 항혈청을 분리하였으며, sodium azide를 0.02%되게 첨가하여 -70°C에 냉동보관하면서 사용하였다.

간접 비경합 ELISA

항체의 역기는 간접 비경합 ELISA(non-competitive ELISA)에 의해 측정하였다. 즉, PA-BSA(PA-BSA[Bc] 혹은 PA-BSA[Po])를 coating buffer(0.02 M Tris buffer, 0.15 M NaCl, pH 9.0)에 10 µg/mL로 희석하여 microplate의 각 well에 100 µL씩 넣고 4°C에서 하룻밤 방치하여 코팅하였다. 각 well를 washing buffer로 3회 세척 후, 항체를 1% BSA가 첨가된 washing buffer(10 mM phosphate buffered saline, pH 7.4, 0.05% Tween-20)로 희석하여 각 well에 100 µL씩 1시간 처리하였다. 세척 후 goat anti-rabbit IgG antibody-HRP를 washing buffer에 희석하여 위와 동일하게 각 well에 100 µL씩 넣은 후 다시 1시간 처리하였다. 그리고, washing buffer로 3회 세척한 다음 기질용액(0.001% H₂O₂, 0.01% TMB, 0.1 mg/mL in phosphate citrate buffer, pH 5.0) 100 µL을 넣어 상온에서 30분 동안 발색반응을 확인한 후 2 M H₂SO₄ 50 µL로 반응을 정지시키고, microplate reader로 파장 450 nm에서 각 well의 흡광도를 측정하였다. 하나의 시료에 대하여 3개씩의 well을 사용하여 얻은 흡광도의 평균값으로 분석하였다.

간접 경합 ELISA(competitive indirect ELISA; ciELISA)

PA-BSA[Po](10 µg/mL)을 coating buffer로 희석하여 microplate에 각각 100 µL씩 넣은 후 4°C에서 하룻밤 방치하여 코팅하였다. Washing buffer로 3회 세척한 후 1% BSA가 첨가된 washing buffer로 희석한 PA 용액과 항 PA-BSA[Bc] 항체를 동량비로 혼합한 용액 100 µL을 넣은 후 1시간동안 반응시켜 경합반응이 일어나도록 하였으며, 다시 washing buffer로 3회 세척하고 나서 나머지 과정은 간접 비경합 ELISA와 같은 방법 즉, goat anti-rabbit IgG antibody-HRP과 기질용액을 반응시킨 후 측정된 흡광도의 평균값으로 분석하였다.

교차반응

PA의 유도체에 대한 교차반응(Cross-reactivities)을 간접 경합 ELISA로 검토하였다. PA-BSA[Po](10 µg/mL)를 microplate에 100 µL씩 넣어 4°C에서 하룻밤 방치하여 코팅하였다. Washing buffer로 3회 세척한 후 1% BSA가 첨가된 washing buffer로 희석한 항 PA-BSA[Bc] 항체와 PA 및 pantothenic acid 유도체인 pantoyllactine, pantetheine, pantothenyl alcohol, acetyl CoA용액을 각각 1:1로 혼합하여 microplate에 100 µL씩 넣어 경합반응이 일어나도록 하였으며, 그 이후 실험

과정은 간접 비경합 ELISA의 과정과 동일하게 실험하여 흡광도를 측정, 분석하였다. 그리고, ciELISA에 의해 얻어진 결과를 가지고 다음 식과 같이 교차반응율을 계산하였다.

$$\text{Cross-reactivity (\%)} = \frac{\text{Conc. of standard PA inhibiting 50\% of Ab binding}}{\text{Conc. of analogue PA inhibiting 50\% of Ab binding}} \times 100$$

미생물을 이용한 분석방법(MBA)

Lactobacillus plantarum(KCCM 11542)를 이용하여 Association of Official Analytical Chemists(AOAC)법에 따라 실시하였다⁽¹⁰⁾. *Lactobacilli* MRS Broth(Difco)에서 균주를 계대배양하였고 pantothenate assay medium(Difco)으로 다음과 같이 분석하였다⁽¹¹⁾.

Lactobacilli MRS agar plate에서 *L. plantarum*의 colony을 따서 MRS broth 10 mL에 접종하여 37°C에서 20시간 배양한 후 원심분리(1,100×g, 10분)하여 균체를 회수하고 멸균한 증류수로 3회 세척하였다. 세척한 균체는 다시 10 mL의 멸균수로 희석하였다. PA의 농도를 0 ng에서 100 ng의 범위 안에서 10 ng 간격으로 달리하여 100 µL씩 첨가한 pantothenate assay medium 10 mL에 희석한 균체를 접종하여 37°C, 22시간 배양하였다. 미생물의 성장도를 620 nm에서의 흡광도로 측정하여 표준곡선을 작성하였다.

시료에서 PA의 추출

식품 시료로부터 PA의 추출은 Finglas⁽¹²⁾와 Walsh⁽²⁾의 방법을 변형하여 행하였다. 계란은 난백과 난황을 혼합한 것을 사용하였고 상추는 잎맥부분이 없는 곳을 골라 사용하였으며 소간은 잘게 썬 후 사용하였다.

시료들을 각각 5 g씩 0.2 M tris buffer(pH 8.0) 10 mL에 넣고 121°C, 15분간 멸균한 후 Omni-Mixer Homogenizer를 이용하여 30분 이상 균질화하였다. 시료 속의 PA의 분리를 위해 calf intestinal alkaline phosphatase(200 unit)와 pigeon liver peptidase를 첨가하여 실온에서 하룻밤 효소 반응시켰다. 이후 0.2 M Tris buffer(pH 8.0)로 부피를 100 mL로 맞추고 원심분리(15,000×g, 20분)하여 상정액을 얻고, 이를 필요시 희석하여 분석에 사용하였다. 이때 pigeon liver peptidase는 많은 양의 PA가 포함되어 있는 pigeon liver acetone powder(2.5%)에서 추출하여 사용하기 때문에 정확한 assay를 위해서 PA를 제거하여야 한다. 그러므로, 50-100mesh Dowex 1-X4 anion exchange resin을

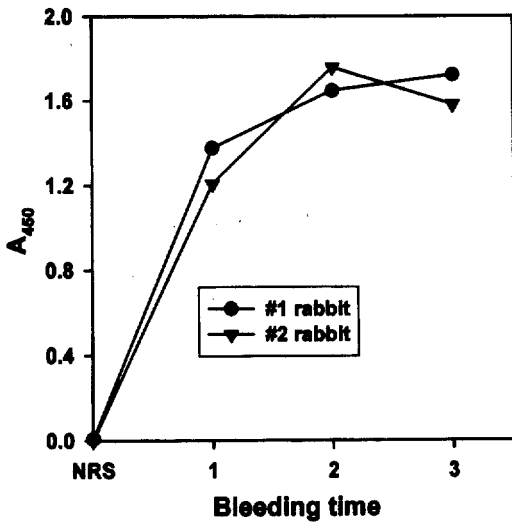


Fig. 2. Production of antibodies by rabbits. Each rabbit was immunized with PA-BSA[Bc] on weeks 0, 2, 4 and 6, and bled once every week after each immunization. NRS; normal rabbit serum.

사용해서 PA를 제거한 후에 시료에 처리하였다.

결과 및 고찰

항 PA-BSA[Bc] 항체의 생산

PA-BSA[Bc]를 면역한 토끼에서 얻은 항혈청의 항체 역가를 간접 비경합 ELISA로 분석한 결과, Fig. 2에 나타난 바와 같이 면역원에 대해 특이적으로 결합하는 항PA-BSA[Bc] 항체가 생성되었음을 확인할 수 있었다. 추가면역에 따라 대체로 항체가가 조금 증가하는 것을 알 수 있었으며, 이 중 항체가가 매우 높고 많은 양의 혈청을 채취한 1번 토끼의 3차 항혈청을 사용하였다.

간접 결합 ELISA

PA를 분석하기 위한 ciELISA의 조건을 확립하기 위하여 두 종류의 항원(PA-BSA[Bc] 혹은 PA-BSA[Po])을 microplate에 코팅을 하고, 1% BSA가 첨가된 washing buffer로 희석한 특이항체를 이용하여 각각 ciELISA로 실험해 본 결과 PA-BSA[Po]을 코팅한 경우에는 양호한 결합반응을 보였다. 이때, PA의 검출한계는 1 ppm이었다(Fig. 3).

PA-BSA[Bc]로 코팅한 경우에는 결합반응이 제대로 이루어지지 않았는데, 이러한 결과는 다음과 같은 결과에 의한 것이라고 생각해볼 수 있다. 즉, PA의

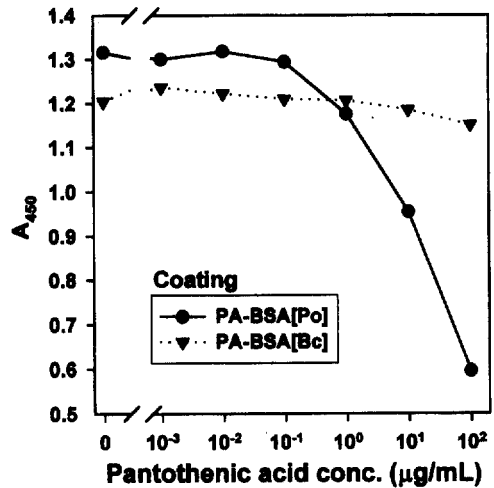


Fig. 3. Standard curves by ciELISA for pantothenic acid. Plate was coated at 10 µg/mL with PA-BSA[Po] and PA-BSA[Bc].

primary alcohol group에 부분적인 구조변형을 유도하여 PA-BSA[Bc] conjugate를 만들고, 이를 면역원으로 하여 생산된 항체는 PA보다 변형된 PA(PA-BSA[Bc])를 아주 잘 인식하는 것으로 추측된다. 따라서 ciELISA에서 코팅항원으로서 PA-BSA[Bc]를 사용한 경우에는 이것에 대하여 특이항체가 결합하는 것을 PA가 전혀 저해하지 못하는 반면에 PA-BSA[Po]를 사용한 경우에는 이것에 대한 특이항체의 결합력이 비교적 약하여 PA가 그 결합을 저해할 수 있었던 것으로 생각된다⁽¹³⁾.

다른 한편, PA-BSA[Po]를 면역해서 얻은 항체의 경우 PA-BSA[Bc]와 PA-BSA[Po]를 코팅한 plate에 ciELISA를 한 결과 경합반응이 제대로 이루어지지 않았다. 이는 위와 마찬가지로 BSA와 PA의 PA-BSA[Po] conjugate를 만드는 과정에서 일어난 구조적인 변화로 인해 이 PA-BSA[Po] conjugate를 면역원으로 하여 생산된 항체는 PA에 대한 특이성이 상당히 떨어지기 때문에, 본 실험에서 경합반응이 일어나지 않았던 것으로 생각되어진다.

항 PA-BSA[Bc]항체의 특이성

특이항체의 특이성을 조사하기 위하여 대표적인 PA 유도체들에 대한 교차반응을 재료 및 방법에 명시한 바와 같이 ciELISA로 검토하였다. Fig. 4에 나타난 바와 같이 특이항체는 Acetyl CoA의 경우 약간의 결합반응을 보이지만 농도가 높아질수록 다른 유도체인 pantoyllactone, pantotheine, pantothenyl alcohol 과 같이 반응성이 없었다. 이는 Morris 등⁽⁷⁾의 경우 CoA와

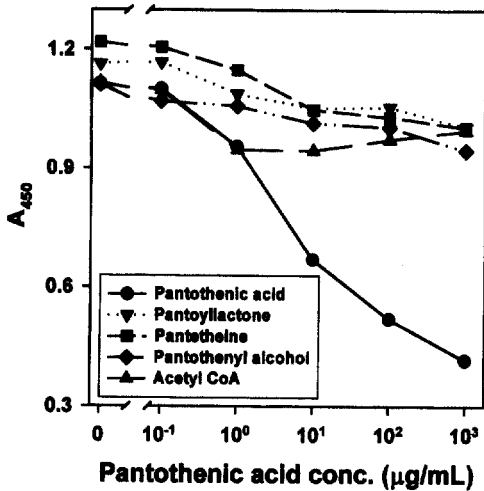


Fig. 4. Cross-reactivities of anti-PA-BSA[Bc] antibody toward PA analogues by ciELISA. Plate was coated at 10 µg/mL with PA-BSA[Po].

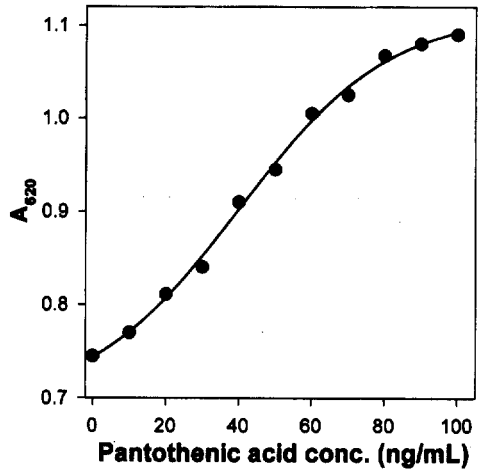


Fig. 5. Microbiological assay Standard curve for pantothenic acid by A. O. A. C. method. Pantothenic acid was added to be 10% of final volume of pantothenate assay medium.

0.1%의 교차반응을, Wyse 등⁽¹⁴⁾의 경우 pantotheine과 0.3%가량의 교차반응을 보인 것과 비교하여 볼 때 PA에 대한 특이성이 높은 것임을 알 수 있었다.

MBA법 및 ciELISA에 의한 PA의 분석

식품시료인 계란, 소간, 상추 중에 존재하는 PA를 MBA법과 ciELISA에 의하여 분석하고, 그 결과를 서로 비교하였다. MBA법에 의해 PA의 검출에 사용한 표준곡선(Fig. 5)으로부터 그 검출한계는 10 ppb인 것을 확인할 수 있었으며, 각 시료로부터 추출해낸 PA 농도를 산출한 결과, 대체로 식품성분분석표⁽¹⁵⁾와 유사한 결과를 보였다(Table 1). 다만, 계란의 경우 2.3배 가량의 높은 분석결과(4.2 mg/100 g)를 나타냈는데, 이는 분석에 사용한 계란은 영양란이었으며, 보통란보다 사양관리를 잘하였기 때문에 PA의 함량이 높았던 것으로 생각된다.

ciELISA 방법으로 시료에 함유되어있는 PA를 분석

하였으며, 그 결과를 MBA 결과와 비교하였다(Table 1). MBA에 대한 ciELISA의 분석회수율의 경우, 계란과 소간은 각각 109% 및 64%로 비교적 양호하였다. 하지만, 상추의 경우 344%로 높은 수치를 나타내었다. 이 결과는 Finglas⁽¹³⁾의 실험에서 MBA에 대한 ciELISA의 분석회수율이 계란과 소간의 경우보다 높은 257%이었던 결과와 유사하였다. 비록 본 실험의 결과가 높게 나타났지만, 상추의 경우 다른 시료와 비교하여 보았을 때 높게 나타난다는 사실을 확인할 수 있었다.

결론적으로 본 실험은 기존의 MBA 분석법과 비교하여 볼 때 PA의 analogue에 대해 교차반응이 매우 낮고, 짧은 분석시간과 많은 시료를 동시에 간편하게 분석할 수 있는 ELISA를 개발하였다. 다만, 검출감도를 높이기 위한 양질의 특이항체생산이 요구된다. 앞으로 많은 식품시료로 PA 분석에 ELISA를 활용함으로써 분석의 효율성을 높일 수 있으리라 생각한다.

Table 1. Comparison for sensitivity between microbiological assay(MBA) and ciELISA for pantothenic acid in food samples

Samle	ELISA				MBA (mg/100 g)	Food Tables ²⁾ (mg/100 g)	Recovery ELISA/MBA (%)
	Dilution ratio	Detected (µg/mL)	Corr. factor ¹⁾	Assayed (mg/100 g)			
Egg	5/100	2.3	2	4.6	4.2	1.8	109
Cow's liver	5/100	2.3	2	4.6	7.2	8.2 ³⁾	64
Lettuce	5/100	0.56	2	1.1	0.32	0.2	344

¹⁾µg/mL → mg/100 g
²⁾Paul and Southgate (1978)
³⁾Lamb's liver.

요 약

PA를 분석하기 위하여 효소면역측정법을 개발하고자 하였다. Bc방법과 Po방법으로 BSA에 PA를 conjugation하여 각각의 PA-BSA conjugate(PA-BSA[Bc]와 PA-BSA[Po])를 제조하였으며, 이를 토끼에 면역하여 항PA-BSA 항체를 얻었다. 항PA-BSA[Po] 항체를 사용한 ciELISA의 결과에서 경합반응이 제대로 일어나지 않았기 때문에, 식품 속에 있는 PA를 검출하기 위해서 PA-BSA[Po]을 코팅한 후 항PA-BSA[Bc] 항체를 사용하였다. 이 결과에서 PA의 검출한계가 1 ppm인 것을 확인할 수 있었으며, 교차반응을 통해 PA 유도체들에 대해서도 항PA-BSA[Bc] 항체가 PA에 대해 특이성이 매우 강하였다. 또한, MBA의 결과에서는 그 검출한계가 10 ppb인 것을 확인할 수 있었다. 분석시료인 계란(109%), 상추(64%), 소간(344%)의 식품시료에 대한 실험에서 상추를 제외하고는 ciELISA는 MBA의 결과와 비교해 볼 때 양호한 결과를 얻을 수 있었다. 그러므로, ciELISA는 MBA보다 분석시간, 교차반응 등의 면에서 장점이 있어 식품 중 PA의 검출에 효과적으로 활용할 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 농림부에서 시행한 1995년 농림수산물특정 연구사업의 지원으로 수행된 연구결과의 일부로서 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Fox, H.M. Pantothenic acid. pp. 437-457 In: Handbook of Vitamins-Nutritional, Biochemical and Clinical Aspects. L. J. Machlin. (ed.). Marcel Dekker, New York (1984)
2. Walsh, J.H., Wyse, B.W. and Hansen, R.G. A comparison of microbiological and radioimmunoassay methods for the determination of pantothenic acid in foods. *J. Food Biochem.* 3: 175-189 (1979)
3. Walsh, J.H., Wyse, B.W. and Hansen, R.G. A comparison of microbiological and radioimmunoassay methods for the determination of pantothenic acid in foods. *J. Food Biochem.* 3: 175-182 (1980)
4. Polesello, A. and Rizzolo, A. Application of HPLC to the determination of water soluble vitamins in foods. *J. Micronutr. Anal.* 8: 105-158 (1990)
5. Shon, D.H., Park, A.P., Seo, B.C., Kim, J.C., Lee, Y.W., Nam, Y.J. and Hawer, W.D. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of aflatoxin B1. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20: 225-232 (1996)
6. Lee, K.A., Shon, D.H., Ko., Y.T. Development of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for analysis of Biotin. *J. Korean Society of Food Sci. Nutr.* 27: 1152-1159 (1998)
7. Wyse, B.W., Wittwer, C. and R. Gaurth Hansen. Radioimmunoassay for Pantothenic acid in blood and other tissues. *Clinical Chemistry* 25: 108-111 (1979)
8. Hermanson, G.T., Mallia, A.K. and Smith, P.K. Use of glycidol to create a periodate-oxidizable matrix, pp. 76. In: *Immobilized Affinity Ligand Techniques*. Academic Press, USA (1992)
9. Cooper, H.M. and Paterson, Y. Production of antibodies. In: *Current Protocols in Immunology*. John Wiley and Sons. (ed.). New York (1991)
10. Howitz, W. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 12th ed., pp. 845-846. A.O.A.C., Washington, DC, USA (1975)
11. DIFCO. Media for microbiological assay of vitamins and amino acids, in *Difco's Technical Information 1977*. Difco Lab., Detroit, MI. (1977)
12. Finglas, P.M., Faulks, R.M., Morris, H.C., Scott, K.J. and Morgan, M.R.A. The development of an enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) for the analysis of pantothenic acid and analogues, part II-Determination of pantothenic acid in foods. *J. Micronutr. Anal.* 4: 47-59 (1988)
13. Finglas, P.M. and Morgan, M.R.A. Application of biospecific methods to the determination of B-group vitamins in food. *Food Chemistry* 49: 191-201 (1994)
14. Wyse, B.W., Wittwer, C. and Hansen, R.G. Radioimmunoassay for pantothenic acid in blood and other tissues. *Clin. Chem.* 25: 108-111 (1979)
15. Paul, A.A. and Southgate, D.A.T. The composition of foods, 4th ed., HMSO, London, UK (1978)

(2000년 6월 15일 접수)