*Kor. J. Food Hygiene 6(3, 4), 111-117(1991)*

# 가축사료중 Zearalenone분석을 위한 Enzyme Linke Immunosrobent Assay법의 개발

하정기 · 정덕화* · 김성영*

*경상대학교 축산학과, *식품공학과*

# Development of Enzyme Linked Immunosrobent Assay for Determination of Zearalenone in Animal Feeds

**Jeung-Key Ha, Duck-Hwa Chung* and Sung-Young Kim***

*Department of Animal Science, *Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Jin-Ju 660-701*

**ABSTRACT－We examined to develop the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for determination of zearalenone in animal feeds. Zearalenone was first converted to 6'-(carboxymethyl) zearalenone oxime(zearalenone oxime) to get a coupling site and then conjugated to bovine serum albumin(BSA) for use as immunogen and to horseradish peroxidase(HRP) for use as enzyme marker. Antibody against zearalenone was obtained after 11 weeks of immunization of rabbit with zearalenone oxime-BSA. Cross reactivity of the antibody with α-zearalenol, β-zearalenol, α-zearalanol and β-zearalanol were 168, 46, 26 and 20% respectiviely. A simple procedure was devised for the screening of zearalenone in feeds using ELISA. Feeds samples(5g) were extracted by blending with 25 ml of methanol-phospate buffered saline-dimethylformate(70 : 29 : 1) and the extract was filtered and aqueous filterate analyzed. It took only 1 hours to do whole procedure for the analysis of zearalenone in feeds by the direct competitive ELISA, and detectable limit was 1-100 ppb. Using this procedure, only 4 of 24 feed samples showed positive results with 3.93～7.43 ppb levels.**

**Keyword□Zearalenone, Enzyme Linked Immunosorbent Assay(ELISA), Immunogen, Antibody, Feeds, Cross Reactivity**

Zearalenone은 옥수수, 쌀, 보리 등의 곡류의 오염원인 *Fusarium*속의 균주가 생산하는 mycotoxin으로써 Mirocha 등[1]에 의해 확인된 이래 미국을 비롯하여 유럽각국에서는 오염의 심각성을 고려하여 꾸준히 연구가 진행되고 있는 실정이다.[2-4] Zearalenone은 β-resorcylic acid lactone으로 우유속에 α-zearalenol 및 β-zearalenol 등으로 대사되어 검출되며 가축의 섭취로 중독이 나타나는데, 가까운 대만, 일본 등지에서도 발생보고가 많다. 그러나 우리나라는 경제성장과 더불어 국민 식생활의 향상으로 인한 축산물의 소비증대와 양질의 위생적인 축산물이 요구로 가축사료의 안정성이 중요시된 이래 mycotoxin의 오염 가능성에 대한 관심이 집중되었으나 외국의 활발한 연구와는 달리 분석기술의 미비, 안정성 등의 문제점으로 체계적인 연구가 되지 못하고 있다.

이와 때를 같이하여 지난해부터 신문 등의 매스컴에서는 미국산 수입곡류의 aflatoxin오염 가능성을 우려하면서 수입전 aflatoxin을 비롯하여 각종 mycotoxin함유 여부의 철저한 검사와 현실적 대응책 수립의 필요성이 제기된 바 있고, 최근에는 일본,

Received for publication 28 October, 1991
Reprint request; Dr. D.H. Chung at the above address

소련에서도 미국산 옥수수의 aflatoxin 오염으로 전면수입을 재고하고 있다는 뉴스가 보도된 바 있으나 우리나라의 경우에는 아직도 정부기관에서의 신속 정확한 분석법이 확립되지 못해 aflatoxin 등의 mycotoxin오염 곡류의 수입 가능성을 배제할 수 없는 실정이다. 곡류에서는 *Aspergillus*속보다 *Fusarium* 속이 많이 존재하는 경향을 나타내고 있고 이러한 곰팡이들이 생산하는 zearalenone을 비롯한 mycotoxin분석방법은 과거엔 TLC, GC, HPLC 등에 의존하였으나[5-11] 이들 방법이 추출과 정제에 많은 시간과 유기용매가 소비되고 넓은 공간, 많은 기구, 그리고 전문인력을 필요로 하여 경제성이 없을 뿐만 아니라 처리과정에서 수반되는 안정성 문제로 실험의 한계성이 노출되었다. 이러한 문제점을 극복하기 위해 radioimmuno assay법[12]이 고안되어 시료속의 aflatoxin을 짧은 시간에 측정할 수 있었으나 방사성 물질의 안정성과 폐기물의 문제점이 대두되었다.

최근 Pestka 등[13,14]은 면역분석법을 도입하여 aflatoxin을 비롯한 mycotoxin의 direct competitive ELISA법을 개발하였다.

ELISA에 의한 분석법은 다량의 시료를 동시에 복잡한 추출없이 적은 양으로 값싸게 측정할 수 있으며 안정한 시약의 사용으로 안정성이 보장되는 잇점으로 전통적인 mycotoxin분석에서 많은 어려운 점을 해결하는 효과적인 방법으로 평가받아 이에 대한 활발한 연구가 진행되고 있다.[15-21] 그러나 아직도 감도 높은 antibody 생산, 효과적인 시료조제 그리고 반응조건개선 등의 실제적으로 당면한 문제들이 남아 있다.[22-27]

이러한 활발한 외국의 연구와는 달리 국내에서는 aflatoxin $B_1$에 대한 기본적인 실험의 답습이외에는 실질적으로 식품 및 곡류 등에서의 분석결과가 거의 없고 특히 *Fusarium*속 곰팡이가 생성하는 mycotoxin인 zearalenone에 대한 연구는 거의 없는 상태로 이 분야에 대한 기초적인 연구와 오염조사가 요청된다.

이러한 실정을 감안하여 본 연구자는 zearalenone에 대한 항체생산을 위해 우선 zearalenone-BSA conjugate를 합성하여 zearalenone의 항원성 증폭을 시키고 이를 이용해 감도 높은 항체를 생산하여 ELISA법을 확립한 후 실제 사료의 원료가 되는 곡류에 있어서의 zearalenone 함량 측정법 개발을 위한 실험을 하여 그 결과를 보고하고자 한다

**Table 1. Sampling for determination of zearalenone by ELISA**

| Source | No. of sample |
|---|---|
| Koryeong(2), Yisung(1), Mungyeong(1) Sungju(2), Gyeongsan(1), Chungdo(1) Chilgok(1), Daegu(1) | 10 |
| Sanchung(2), Mylyang(1), Changyeong(1) Sachun(1), Kosung(1), Hadong(2) Yiryeong(1), Jinyang(3), Hamyang(1) Guchang(1) | 14 |
| Total | 24 |

## 재료 및 방법

**실험재료**－Zearalenone 오염정도를 측정하기 위한 실험재료는 1991년 1월부터 영남지방에서 Table 1과 같이 sampling하여 zearalenone 분석용 시료로 사용하였다.

또한 실험에 사용한 Tween 20, bovine serum albumin(BSA), 2, 2′-azino-di-3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid(ABTS), N-hydroxysuccinimide (NHS), horseradish peroxidase(HRP) 및 zearalenone은 Sigma사로부터 구입하였으며, 1, 3-dicyclohexycarbodimide(DCCD)는 Aldrich사로부터 구입하였고 그외 화학약품은 분석용 특급시약을 사용하였다.

**Zearalenone-oxime-BSA conjugate 합성**－Zearalenone의 유도체의 합성은 Fig. 1과 같이 행하였다. 즉, 일정량의 표준 zearalenone을 pyridine에 녹이고 carboxymethylamine을 첨가한 다음 실온에서 24시간 교반하면서 반응시켰다. 반응물은 진공하에서 건조시키고 다시 $H_2O$ 50 m*l*에 녹였다.

반응액중 반응하지 않은 zearalenone을 $H_2O$로부터 분리하기 위해 50 m*l* benzene으로 추출하였다. 반응액으로부터 HCl을 첨가하여 zearalenone-oxime을 침전시키고 zearalenone-oxime을 ethylacetate로 여과시킨 후 건조시켜 10 m*l*로 정용하였다.

그리고, dimethylformic acid에 zearalenone-

Disolve zearalenone in pyridine
↓
Add carboxymethylamine
↓
Stirr 24 hour at room temp
↓
Dry under vaccum to residue
↓
Disolve in $H_2O$
↓
Unreacted zearalenone is removed from $H_2O$
↓
Precipitate zearalenone-oxime
↓
Extract Z-oxime with 100 ml ethyl acetate
↓
Dry to known volume

**Fig. 1. Procedure of zearalenone-oxime conjugate.**

oxime을 녹이고(A액) 여기에 300 μM로 DCC와 600 μM NHS을 만들어서 DMS에 녹인다(B액). 그리고 bovine serum albumin(BSA)을 10 ml의 $NaHCO_3$ 용액에 녹인다(C액). 먼저 A액과 B액을 천천히 섞은 다음 24℃에서 30분 교반하면서 반응시키고 침전물을 원심분리해서 제거하였다. 여기에 protein solution을 첨가하여 4℃에서 2시간 반응하여 이것을 pH 8.0의 $Na_2HPO_4$용액을 사용하여 투석시켜 정제한 후 일정량으로 정용한 다음 냉동건조시키고 −20℃에 보관하여 실험에 사용하였다.

**Antibody 생산**−Zearalenone oxime-BSA conjugate를 complete Freund's adjuvant와 유화시켜 1차 injection을 실시하고 난 다음 일정기간 후 incomplete Freund's adjuvant와 유화시켜 booster injection을 필요에 따라 실시하였다. 1차 injection후부터 적당한 간격으로 blooding하면서 antibody titer를 실시하고 감도가 높은 것은 유안 침전법으로 정제하였다. 즉 상등액 반정도의 포화유안용액을 magnetic stirrer로 교반하면서 1방울씩 떨어뜨려 serum을 침전시켜 원심분리하는 조작을 3번이상 반복하였다. 수거한 serum을 처음량의 PBS로 녹이고 3일간 4℃에서 투석시킨 다음 원심분리하여 침전물을 버리고 antibody titer를 한 다음 감도가 높은 것은 냉동건조시켜 −20℃에서 보관하면서 필요에 따라 실험에 사용하였다.

**Antibody 반응조건**−Liu 등[2]의 방법을 참조하여 반응조건을 개선하기 위해 methanol, acetone 등의 각종 유기용매에 대한 peroxidase 저해유무 검색과 coating용액결정, 단계별 최적반응을 조사하고, 특히 antibody의 zearalenone 유사물질 즉 α-zearalenol, β-zearalenol, α-zearalanol, β-zearalanol과의 cross activity 등을 조사하였다.

**Enzyme-Linked Immunosorbent Assay의 확립**−위의 결과를 Warner 등[3]이 최근 개발한 기술을 참고하여 antibody titer, antibody 특이성 및 각종 시료의 zearalenone 함량측정 조건을 확립하였다. 즉, antibody를 적당히 희석하여(1 : 100～1000) microtiter plate에 125 μl씩 주입하여 40℃건조기에서 하룻밤 방치하여 coating한 다음 washing buffer로 씻는다. 표준 zearalenone과 zearalenone oxime-HRP 최적 희석액을 동일량 혼합 후 100 μl씩 well에 주입한 후 37℃에서 30분 배양하였다. Washing buffer로 다시 씻은 plate는 일정량의 기질(2, 2′-azino-di-3-ethylbenzthioazoline sulfonic acid)을 첨가하여 결합된 zearalenone oxime-HRP를 발색시키고 10～30분 후 반응정지액 100 μl씩을 가해 반응을 정지시켜 ELISA reader로서 흡광도(410 nm)을 측정하여 미리 작성해 둔 표준곡선과 비교하여 그 함량을 계산하였다.

**사료중 zearalenone 함량측정 조건**−시료속에 표준 zearalenone을 넣어 회수율과 표준곡선을 구하기 위해 Roscoe 등[4]의 방법으로 100 μg/ml농도로 zearalenone을 methanol에 녹인 다음 10g의 대조시료에 첨가하여 마지막 농도가 1～100 ppb되게 한 다음 각 시료가 든 병을 뚜껑하여 methanol을 첨가한 채 후드내에서 하룻밤 방치한다. 다음날 시료를 methanol-0.01 M PBS-dimethylformide(70 : 29 : 1)로 5분간 추출하여 Whatman No. 4여지로 여과한 다음 ELISA로 분석하여 시료성분이 ELISA에 미치는 영향을 조사하였다. 아울러 Table 1과 같이 수거한 시료의 zearalenone함량 측정을 위해서는 시료 5g에 5배의 methanol-0.01 M PBS-dimethylformide(70 : 29 : 1)로 5분간 추출하고 Whatman No. 4여지로 여과한 것을 ELISA분석용 시료로 하여 실험에 사용하였다.

## 결과 및 고찰

**Antibody의 생산 및 특성**−앞서 얻어진 zearale-

**Table 2. Reactivity of zearalenone analogue in competivite direct ELISA**

| Analogue | Cross reactivity(%) |
|---|---|
| Zearalenone | 100 |
| α-zearalenol | 168 |
| β-zearalenol | 46 |
| α-zearalanol | 26 |
| β-zearalanol | 20 |

none-oxime-BSA conjugate를 사용하여 New Zealand white rabbit에 면역시켜 antibody생산을 하였다.

- 먼저 1500 μg(500 μg×3 rabbits)의 zearalenone-oxime-BSA를 1.5 ml의 saline에 녹이고 여기에 3 ml Freund's complete adjuvant를 syringe에 준비하여 conector로 연결하여 10~30분간 emulsion시켰다. 이것을 실험토끼의 뒷부분에 multiple site(30~40 site)로 1차 면역시켰다. 다시 750 μg(250 μg×3 rabbits)의 zearalenone-oxime-BSA를 500 μl의 saline에 녹이고 2.5 ml의 Freund's incomplete adjuvant와 10~30분간 emulsion시킨 다음 그 중 1.25 ml씩을 토끼의 뒷다리 부분에 booster injection시켰다. Booster injection시킨 토끼로부터 1주일 간격으로 blooding하면서 antibody생성여부를 조사한 결과 그 중 1한마리의 rabbit가 11주 후에 titer value가 높은 antibody를 생산하였으며 생산된 antibody는 유안 침전법[13]으로 정제한 다음 −20℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

정제된 antibody의 반응조건을 살펴보기 위해 Roscoe 등[4]의 방법에 준하여 반응조건과 특히 zearalenone analogue인 α-zearalenol, β-zearalenol, α-zearalanol 및 β-zearalanol 등에 대한 cross activity를 조사한 결과 Table 2에서 보는 바와 같이 α-zearalenol는 zearalenone보다 오히려 큰 cross activity를 나타내었으며, 그외 analogue와는 적은 값을 보였다.

그러나 일반적으로 mycotoxin에 대한 antibody는 항원으로 사용된 mycotoxin과 구조적으로 유사한 analogue와는 상당한 특이성을 갖는데 상기의 antibody로 ELISA를 행할 경우 만약 시료속에 zearalenone의 analogue가 있다면 total zearalenone으로 정량될 수도 있으므로 식품이나 사료속 total zearalenone의 함량을 측정하는데는 어려움이 없을 것으로 사료된다. 그러나 보다 특이한 antibody의 개발이 필요하며, 이에 대한 monoclonal antibody를 이용한 ELISA법을 확립하기 위해 실험을 계속하고 있다.

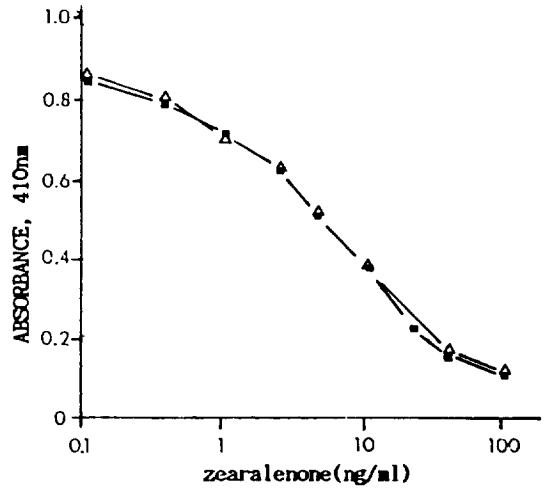


**Fig. 2. Competitive direct ELISA standard curve for zearalenone.**
■—■: Standard zearalenone in solvent, △—△ : Standard zearalenone extracted from spiked sample

**시료중 zearalenone함량**—위에서 얻은 항체를 Roscoe 등[4]의 반응조건을 참조하여 표준 zearalenone으로 표준곡선을 작성하고 아울러 시료의 구성성분 자체가 ELISA법에 의한 zearalenone검색을 위한 ELISA에 미치는 영향을 조사하여 zearalenone함량 검색 가능성 여부를 확인하였다. Zearalenone에 오염되어 있지 않은 시료에 표준 zearalenone 마지막 농도가 1~100 ppb 되게 spike시킨 다음 공시 추출액으로 추출하여 시료로 한 다음 ELISA로 행한 결과 Fig. 2와 같이 곡류의 구성성분이 ELISA수행에 거의 영향이 없는 것으로 나타내었다.

이 결과를 토대로 영남지방 곡류의 zearalenone 오염현황을 조사하기 위한 연구의 일환으로 영남지방에서 모두 24개의 곡류 시료를 수거하여 분석을 행한 결과를 종합하여 보면 Table 3과 같다. Zearalenone은 4개의 시료가 positive로 16.7%의 오염도를 나타내었으나 그 수준은 매우 낮았다. 최근 Ram 등[24]은 시판용 땅콩 60점을 시료로 하여 aflatoxin $B_1$의 오염정도를 ELISA법으로 확인한 결과 3개의

**Table 3. Summary of natural occurence of zearalenone in sample analyzed**

| | |
|---|---|
| Tatal sample | 24 |
| Positive sample | 4 |
| Ratio of sample contamination(%) | 16.7 |

**Table 4. Contents of zearalenone in sample analyzed by ELISA**

| Sample No. | Location | Zearalenone (μg/kg) | CV.[a)] |
|---|---|---|---|
| R- 3 | Daegu | 3.93± 0.61 | 15 |
| R- 8 | Kosung | 6.51± 2.18 | 33 |
| R-14 | Jinyang | 4.45± 0.69 | 16 |
| R-17 | Guchang | 7.43± 2.23 | 30 |

a): Coefficient of variation.

시료가 positive를 보였다고 발표한 바 있다. Zearalenone함량은 Table 4에서와 같이 positive로 나타난 4개의 시료중 고성에서 채취한 시료 R-17이 7.34 μg/kg으로 나타났고 R-8, R-14 및 R-3이 각각 6.51, 4.45 및 3.93 μg/kg을 나타내었으며, 곡류재배 지역에 따라 zearalenone의 오염에 다소 영향을 미치는 것으로 사료되었다.

일반적으로 microtiter를 이용한 competitive direct ELISA의 경우에는 많은 시료를 단시간에 분석할 수 있으며, 폐기물의 처리문제가 없고 사용되는 시약이 대부분 안정하고 독성이 없어 안정성이 보장된 방법으로 평가되고 있다. 최근 Roscoe 등[4]은 각종 곡류식품을 대상으로 zearalenone과 aflatoxin $B_1$ 오염여부를 조사한 결과 zearalenone의 경우에는 79종의 시료에서 62종이 양성 반응을 보이고 최고 130 μg/kg의 zearalenone이 검출되어 곡류식품에의 zearalenone 오염이 심각함을 나타내고 있다.

현재 미국에서는 Pestka,[22] 그리고 Yaguan과 Chu[26]을 비롯한 여러학자들이 aflatoxin $B_1$, $M_1$, Sterigmatocystin, zearalenone, ochratoxin 등의 각종 mycotoxin의 ELISA법 응용을 위해 peroxidase의 활성저해가 없는 시료추출물의 조제조건, 최적반응조건에 관한 광범위한 실험과 아울러 실제 ELISA test kit생산을 시도하는 등 활발한 연구가 진행되고 있으며, 그 중 aflatoxin $B_1$은 강도높은 antibody가 생산되어 실제 식품속의 함량을 용이하게 측정할 수 있는 기술이 상당한 수준으로 향상되어 있다.

일반적으로 면역학적 분석법에 의한 mycotoxin의 정량은 분석방법과 사용하는 항체의 종류와 특성에 따라 그 감도에 차이가 있지만 대체로 시료 g당 0.2~200 ng정도이며, 1회용 polystylene 시험관을 사용하는 macro ELISA나 1회용 plastic micro titeration plate(96 well)를 쓰는 micro plate ELISA는 식품가공 분야에서의 분석에도 매우 바람직한 것으로 생각된다. 비록 한정된 시료이고 그 오염정도가 낮지만 처음으로 곡류에서의 mycotoxin의 함량을 ELISA법에 의해 조사한 본 실험의 결과는 앞으로 농산물을 비롯한 식품에서의 유해 미생물의 검색과 mycotoxin오염정도의 광범위한 조사와 오염예방책을 수렴하는데 기초자료로 사용될 것으로 사료되는 바이다.

## 감사의 글

본 연구는 1990년도 문교부 자유과제 학술연구조성비에 의하여 수행되었으며 이에 깊은 감사를 표하는 바입니다.

## 국문요약

가축사료중 zearalenone분석을 위한 enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) 법의 개발을 위해 우선 zearalenone의 항원성을 증폭시키기 위해 zearalenone oxime 유도체를 합성한 다음 bovine serum albumin(BSA)와 conjugate를 만들고, 이를 항원으로 토끼에 면역시켜 11주에 zearalenone에 특이한 항체를 얻었다. 생성된 항체를 zearalenone외에 α-zearalenol과는 강한 cross reactivity를 나타내었고 β-zearalenol, α-zearalanol 및 β-zearalanol과는 약간의 반응을 보였으며 확립된 ELISA조건은 다음과 같다. 먼저 시료를 methanol-phosphate buffered saline-dimethyl formate(70 : 29 : 1)을 4배 첨가하여 blending한 다음 Whatman No. 4를 통한 여액을 ELISA시료로 사용하였다. 효소반응시간과 발색시간은 각각 37℃에서 30분과 15분이었고, 흡광도는 410 nm에서 ELISA reader로서 측정하였으며, 측정한계는 1～100 ppb로 매우 낮았다. 확립된 ELISA조건으로 실제시료의 zearalenone오염도를 측정한 결과 24개 시료중 4개의 시료가 양성반응을 보였고 그 함량범위는 3.93～7.43 μg/kg이었다.


## 참고문헌


1. Mirocha, C.J., Pathre, S.V. and Christensen, C.D.: Mycotoxins in human and animal health. Pathotox Publishers, Inc., Park Forest South, IL. 345-364 (1977).
2. Ming-Tsung Liu, Bhanu P. Ram, L. Pattrick Hart, and James J. Pestka: Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the mycotoxin zearalenone, *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**(2), 332-336 (1985).
3. Roscoe Warner, Bhanu P. Ram, L. Patrick Hart, and James J. Pestaka: Screening for zearalenone in corn by competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay., *J. Agric. Food Chem.*, **34**(4), 714-717(1986).
4. Roscoe, L. Warner and James J. Pestka: ELISA survey of retail grain-based food products for zearalenone and aflatoxin $B_1$. *J. Food protection*, **50**(6), 502-503 (1987).
5. Campbell, A.D., Francis Jr, O.J., Beebe, R.A. and Stoloff, L.: Determination of aflatoxins in peanut butter, using two liquid chromatographic method: collaborative study. *J. AOCA.*, **67**, 312-316 (1984).
6. Chang, H.L., Devries, J.W. and Hobbs, W.E.: Comparative study of two methods for extraction of aflatoxn from peanut meal and peanut butter. *J. AOAC.*, **62**, 1281-1284 (1979).
7. Devries, J.W. and Chang, H.L.: Comparision of rapid high pressure liquid chromatographic CB method for determination of aflatoxins in corn and peanuts. *J. AOAC.*, **67**, 597-600 (1984).
8. Itill, R.A., Blakenship, P.D., Cole, R.J. and Timothy H. Sanders: Effects of soil moisture and temperature on prehavest invasion of peanuts by aspergillus flavus group and subsequent aflatoxin development. *App. Environ. Microbiol.*, **45**, 628-633 (1983).
9. Wogan, G.N. and Newberne, P.M.: Dose-response characteristics of aflatoxin $B_1$ carcinogenesis in the rat. *Cancer Res.*, **27**, 2370-2376 (1984).
10. Ferguson-foos, J. and Warren, J.D.: Rapid HPLC determination of aflatoxin $M_1$ and $M_2$ in fluid milk. *J. AOAC.*, **67**, 1111-1114 (1984).
11. Scott, P.M., Panalaks, T., Kanhere, S. and Miles, W.F.: Determination of zearalenone in cornflakes and other corn-based foods by thin layer chromatography, high pressure liquid chromatography and gas liquid chromatography/high resoultion mass spectroscopy. *J. AOAC.*, **61**, 593-600 (1978).
12. Pestka, J.J., Yaguan Li, William O. Harber, and Fun S. Chu.: Comparision of radioimmunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay for determining aflatoxin $M_1$ in milk. *J. AOAC.*, **64**(2), 294-301 (1981).
13. Pestka, J.J., Gaur, P.K. and Chu, F.S.: Quantitation of aflatoxin $B_1$ antibody by an enzyme-linked immunosorbent microassay, *Appl. Environ. Microbiol.*, **40**(6), 1027-1031 (1980).
14. Pestka, J.J., Lee, S.S., Lau, H.P. and Chu, F.S.: Enzyme linked immunosorbent assay for T-2 toxin, *J. AOCS.*, **58**, 940-944 (1981).
15. Camdlish, A.A.G., Stimon, W.H. and Smith, J.E.: A monoclonal antibody to aflatoxin $B_1$ detection of the mycotoxins by enzyme immunoassay. *Let. Appl. Microbiol.*, **1**, 57-59 (1979).

16. Casle, W.L.: Inhibition of protein synthesis in maize and wheat by trichothecene mycotoxins and hybridoma-based immunoassay for deoxynivalenol. Ph. D. Thesis, Michigan State University, (1987).
17. Gendloff, E.H., Pestka, J.J., Dixon, D.E. and Hart, L.O.: Production of a monoclonal to T-2 toxin with strong cross-reactivity to T-2 metabolites. Phytopathology, **77**, 57-59 (1987).
18. Goding, L.W.: Antibody production by hybridomas, *J. Immunol. Methods*, **39**, 285-308 (1980).
19. Hu, W.S., Woychik, N. and Chu, F.S.: ELISA of picogram quantities of aflatoxin $M_1$ in urine and milk. *J. Food Prot.*, **47**, 126-127 (1984).
20. Lawellin, D.W., Grant, O.W. and Joyce, B.K.: Enzyme-linked immunosorbent analysis of aflatoxin $B_1$. *Appl. Environ. Microbiol.*, **34**, 94-96 (1977).
21. Woychik, N., Hinsdill, R.D. and Chu, F.S.: Production and characterization of monoclonal antibodies against aflatoxin $M_1$. *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**, 1096-1099 (1984).
22. Pestka, J.J., Liu, M.T., Knudson, B.K. and Hogberg, M.G.: Immunization of swine for production of antibody against zearalenone. *J. Food Prot.*, **48** (11), 953-957 (1985).
23. Ram, B.P., Hart, L.P., Shotwell, O.L. and Pestka, J.J.: Enzyme-linked immunosorbent assay of aflatoxin $B_1$ in naturally contaminated corn and cottonseed. *J. AOAC.*, **69**, 904-907 (1986).
24. Ram, B.P., Hart, L.P., Core, R.J. and Peskta, J.J.: Application ELISA to retail survey of aflatoxin $B_1$ in peanut butter. *J. Food Prot.*, **49**, 792-795 (1986).
25. Dixon, D.E., Warner,R.L., Ram, B.P.,Hart, L.P. and Pestka, J.J.: Hybridoma cell line production of a specific monoclonal antibody to the mycotoxins zearalenone and α-zearalenol. *J. Agric. Food Chem.*, **35**(1), 122-0126 (1987).
26. Li, Y. and Chu, F.S.: Production and characterization of antibody against sterimatocystin. *J. Food Safe*, **6**, 119-127 (1984).
27. Michael, R.A., Morgan,Angray S. Kang and Henry W.S. Chan: Production of antisera against sterigmatocystin hemiacetal and its potential for use in an enzyme-linked immunosorbent assay for sterigmatocystin in barley. *J. Sci. Food Agric.*, **37**, 873-889 (1986).