J. Fd Hyg. Safety, 13(2), 129 - 134(1998)

Nivalenol의 검출을 위한 효소면역측정법

손동화† · 이향범 · 곽보연 · 김수호 · 권창희*
*한국식품개발연구원, *수의과학연구소*

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Nivalenol

Dong-Hwa Shon†, Hyang-Burm Lee, Boyeon Kwak, Soo-Ho Kim and Chang-Hee Kweon*
Korea Food Research Institute, Seongnam 463-420, Korea
**Veterinary Research Institute, Anyang 430-016, Korea*

ABSTRACT — To develop an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for nivalenol (NIV), we produced polyclonal antibodies against tetraacetyl nivalenol (Ac4-NIV) and established ELISA conditions. Ac4-NIV-hemisuccinate conjugated to bovine serum albumin (Ac4-NIV-HS-BSA) was immunized with Freund's adjuvants into rabbits subcutaneously several times. By use of the antiserum showing the highest titer and Ac4-NIV-HS-HRP conjugate, we established competitive direct ELISA (cdELISA). Standard curve of cdELISA showed that the detection range of Ac4-NIV was about 10~5,000 ng/m*l* (ppb). The cross-reactivities of the polyclonal antibody towards Ac4-NIV and acetyl T-2 were 100 and 70% respectively, and those towards NIV, deoxynivalenol, 3-acetyl deoxynivalenol, 15-acetyl deoxynivalenol, triacetyl deoxynivalenol, fusarenon-X, and T-2 were less than 0.1%. When cdELISA was applied to NIV-spiked corns followed by extraction with 70% acetonitrile and acetylation with acetic anhydride in pyridine, the recovery rates of the Ac4-NIV were 108, 143, and 70% (average, 107%) in the levels of 100, 300, and 1,000 ng/g (ppb), respectively.

Key words □ nivalenol, tetraacetyl nivalenol, polyclonal antibody, ELISA, corn

니발레놀(nivalenol, NIV)은 *Fusarium nivale*이나 *F. graminearum*과 같은 *Fusarium*속 곰팡이가 생산하는 독성 이차대사산물로서 주로 곡물에서 deoxynivalenol(DON)과 함께 자주 검출되고 있다.[1-3] 특히 보리와 같은 국내산 농산물에서 NIV의 오염도가 높은 것으로 보고된 바 있다.[4] NIV는 세포독성을 갖고있어 장출혈, 면역독성, 백혈구감소, 식이거부 등의 증상을 나타내며 특히, 생쥐에서의 급성독성이 DON의 경우보다 훨씬 강한 것으로 알려져있어 더욱 주의를 요한다.[5] 이들의 구조를 Fig. 1에 나타내었다.

한편, 수입개방에 따라 농산물의 수입량이 최근 급격히 증가하고 있으며, 이들 중에 오염된 곰팡이독소는 식품안전성의 면에서 감시를 요한다. 기존의 분석방법으로 많은 시료중의 곰팡이독소를 검출하는데는 현실적으로 장비, 인력 등의 면에서 제약이 따르므로 이를 효율적으로 분석하기 위하여는 효소면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)의 도입이 절실히 요구된다.

Teshima 등[6]과 Ikebuch 등[7]은 tetraacetyl NIV(Ac4-NIV)에 대한 항혈청 및 단클론항체를 생산하기 위하여 Ac4-NIV-HS-BSA를 면역원으로 사용하였으며, radioimmunoassay(RIA)와 ELISA를 개발하였다. 또한, Wang 등[8]은 triacetyl-15-pimelate NIV를 hapten으로 하여 Ac4-NIV에 특이적인 항혈청를 얻었으며 이를 이용한 RIA를 개발하였다.

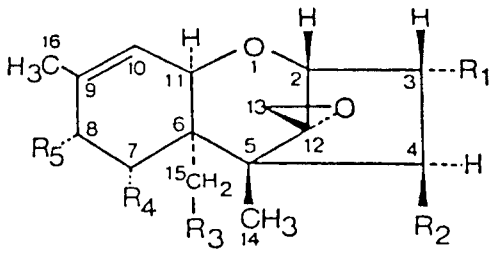
그러나, 국내에서는 NIV의 검출을 위한 면역분석법에 대한 연구가 이루어진 바 없어 본 연구에서 ELISA분석방법을 개발하고자 하였다. 즉, 실험동물을 이용하여 Ac4-NIV에 대한 항체를 생산하고, 이를 이용한 분석법을 확립하여 옥수수시료 중의 분석회수율을 검토하였다.

재료 및 방법

재료

Nivalenol(NIV), deoxynivalenol(DON), 3-acetyldeoxyni-

†Author to whom correspondence should be addressed.



Trichothecene	Side-chain residue				
	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5
Nivalenol (NIV)	OH	OH	OH	OH	=O
Tetraacetyl NIV (Ac4-NIV)	OAc	OAc	OAc	OAc	=O
Deoxynivalenol (DON)	OH	H	OH	OH	=O
3-Acetyl DON (3Ac-DON)	OAc	H	OH	OH	=O
15-Acetyl DON (15Ac-DON)	OH	H	OAc	OH	=O
Triacetyl DON (Ac3-DON)	OAc	H	OAc	OAc	=O
Fusarenon-X	OH	H	OH	OH	=O
T-2 toxin	OH	OAc	OAc	H	ISV
Acetyl T-2 toxin (Ac-T-2)	OAc	OAc	OAc	H	ISV
Scirpenol	OH	OH	OH	H	H

OAc, $OCOCH_3$; ISV, isovalerate

Fig. 1. Chemical structure of nivalenol (NIV) and its related trichothecenes.

valenol(3Ac-DON), 15-acetyldeoxynivalenol(15Ac-DON), fusarenon-X, T-2 등 표준독소, bovine serum albumin (BSA), horseradish peroxidase(HRP)와 succinic anhydride, 1-ethyl-3(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide(EDC), Tween 20 등은 Sigma사의 제품을 사용하였고, thin layer chromatography(TLC)용 plate는 Merck사 SG60을 사용하였다. Goat anti-rabbit IgG-HRP conjugate, Freund's complete adjuvant와 incomplete adjuvant, 단백질 정량용 micro BCA kit(#23235), 항체정제용 protein A column(Immuno-Pure Plus IgG Purification Kit, #44679), 기질인 TMB(5'-tetramethyl benzidine dihydrochloride)는 Pierce사의 제품을 사용하였다. 기타의 시약과 유기용매는 GR급 이상을 사용하였다.

실험동물로 사용한 체중 3 kg 가량의 New Zealand White 웅성토끼는 삼육실험동물연구소(경기도 오산)에서 구입하였으며, Microtiter plate는 Nunc사의 Maxisorp™(#446612)를, microplate reader는 Molecular Devices사의 THERMOmax™을 사용하였다.

면역원의 제조

면역원인 tetraacetyl-NIV-hemisuccinate-BSA(Ac4-NIV-HS-BSA)를 다음과 같이 준비하였다.[6] 먼저 NIV 10 mg를 5%의 dimethylaminopyridine을 함유한 acetonitrile 10 m*l*에 녹인 후, 4%의 acetic anhydride를 함유한 acetonitrile 10 m*l*을 첨가하고 상온에서 1시간 반응시켜 Ac4-NIV로 변환시켰다. 이후 2 M의 sodium borohydride용액 2 m*l*을 첨가하여 환원시킨 후 건조하였다. 여기서 얻은 8-OH-Ac4-NIV 4 mg을 3 m*l*의 pyridine에 녹여 succinic anhydride 36 mg과 N, N'-dimethyl-aminopyridine 2 mg을 첨가하여 100°C에서 하룻밤 반응시켰다. 여기에 증류수 3 m*l*를 첨가하고 1 N HCl로 pH 3의 산성조건을 만든 후 chloroform 10 m*l*로 추출하였다. 용매층을 취하여 3% $NaHCO_3$용액 3 m*l*로 3회 추출하여 무수 Na_2SO_4로 건조시켜 농축하였다. 반응산물인 Ac4-NIV-HS의 정제는 silica gel plate를 이용한 prep. TLC를 이용하여 전개후 용매로 회수하였다. 여기서 얻은 Ac4-NIV-HS 6 mg을 dimethylformamide 0.5 m*l*에 녹이고 12.5 m*l*의 증류수에 녹인 25 mg의 BSA이나 HRP와 혼합하고 여기에 15 mg의 EDC를 처리한 다음 10분후 다시 EDC를 5 mg 첨가하고 교반하면서 18시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 투석이나 Sephadex G-25 column으로 탈염하고 Ac4-NIV-HS-BSA 및 Ac4-NIV-HS-HRP conjugate를 얻었다. 반응전후의 단백질에 존재하는 free amino기를 trinitrobenzene-sulfonate(TNBS)법[9]으로 분석한 결과 hapten과 carrier protein간의 몰비는 약 10:1이었다. Ac4-NIV-HS-HRP도 이 방법에 준하여 준비하였다.

또 다른 면역원으로 사용하기 위한 NIV-oxime-KLH는 다음과 같이 준비하였다.[10] NIV 10 mg을 pyridine 0.5 m*l*에 녹이고 carboxymethoxylamine hemihydrochroride 20 mg을 첨가하여 상온에서 24시간 교반한 후 진공건조하였다. 이를 증류수 5 m*l*에 녹이고 pH 8로 맞춘 후 oxime으로 전환되지 않은 NIV를 benzene으로 세정하고 ethyl acetate로 추출하고 증발농축하여 NIV-8-oxime을 얻었다. KLH 20 mg을 PBS 2 m*l*에 녹이고 EDC 40 mg과 sulfo-NHS 1.7 mg을 첨가하고 여기에, 0.2 m*l*에 녹인 NIV-oxime 4 mg을 첨가한 다음 37°C 12시간 교반후 원심분리하여 얻은 상징액을 투석함으로써 NIV-oxime-NIV를 얻었다.

특이항체의 생산

토끼 한 마리당 1.5 m*l*의 complete Freund's adjuvant와 0.5 m*l*의 0.1M PBS에 용해한 면역원 500 μg을 양 뒷발바닥에 면역하였다. 추가면역은 마리당 0.5 m*l*의 PBS에 용해한 500 μg의 항원을 0.5 m*l*의 incomplete Freund's adjuvant와 함께 2~3주 간격으로 등에 피하주사하였다. 면역 1주일 후에 각각 귀의 정맥으로 부터 채혈하였다. 채혈후 항혈청을 분리하고 0.02% NaN_3를 첨가하여 냉동보관하면서 실험에 사용하였으며, 항체의 정제를 위하여 Protein A column으로 IgG를 분리하고 PBS에 대하여 투석했다.

NIV 및 유사독소의 acetylation

NIV 등 표준독소의 acetylation은 다음과 같이 실시하였다. 5% dimethyl aminopyridine-acetonitrile(5:95, v/v) 150 u*l*에 500 ug의 NIV 등을 acetic anhydride-acetonitrile(4:96, w/v) 150 u*l*에 반응시킨 다음 200 u*l*의 MeOH을 첨가하여 반응을 끝내고 PBST로 희석하여 이후의 실험에 사용하였다.

한편, 시료로 부터 NIV의 추출 및 acetylation은 다음과 같이 실시하였다. 즉, 30 m*l*의 acetonitrile-물(7:3, v/v)을 10 g의 시료에 첨가하여 30분간 교반하였다. 여과후 여액에 30 m*l*의 hexane을 첨가하여 이를 다시 5분간 교반하였다. 수용acetonitrile층을 취하여 농축건조하였다. Acetylation은 건조 잔여물(10 g 시료상당의)을 400 μ*l*의 pyridine-acetic anhydride에 녹이고 2시간 동안 상온에서 acetylation 후에 3.5 m*l*의 MeOH에 30분간 방치한 후 0.06 N HCl 46.5 m*l*로 희석하였다. 이 용액을 PBST로 희석하여 분석에 사용하였다.

효소면역측정법(ELISA)

특이항체의 생산을 확인하기 위한 ELISA는 비경합 간접법(non-competitive indirect ELISA)으로 행하였다. 즉, coating buffer(0.02 M tris, 0.15 M NaCl, pH 9.0)에 2 ug/m*l* 농도로 용해한 면역원 100 u*l*을 microplate의 각 well에 분주하고 냉장하에서 하룻밤 coating하고 PBST(Tween20을 0.05 % 함유한 PBS, pH 7.4) 150 u*l*로 3회 세척한 다음, PBST로 5000배 희석한 항혈청 100 u*l*을 각 well에 첨가하고 상온에서 1시간 방치하였다. 그후 앞에서와 같이 세척후 PBST로 적당배율희석한 anti-rabbit IgG-HRP를 첨가하고 상온에서 1시간 방치하고 세척후 기질용액(0.01% TMB, 0.05 M phosphate citrate buffer, pH 5.0, 사용직전에 H_2O_2를 최종 0.02 %가 되도록 첨가) 100 u*l*를 넣고 상온에서 30분간 처리하여 발색시킨 다음 반응정지액(2 M H_2SO_4) 50 μ*l*를 첨가하였다. Microplate reader로 파장 450 nm에서 well의 흡광도를 측정하였으며 각 처리당 3개씩의 well을 사용하여 얻은 흡광도의 평균값으로 분석하였다.

Ac4-NIV의 정량을 위한 ELISA는 정제한 특이항체를 microplate에 coating하고 여기에 Ac4-NIV-HS-HRP conjugate를 Ac4-NIV와 경합시키는 직접 경합법(competitive direct ELISA, cdELISA)으로 행하였다. 즉, 앞의 coating buffer에 1/1,000로 희석한 항체용액을 앞에서와 같이 하룻밤 처리하고 세척후, PBST에 1/2,000로 희석한 Ac4-NIV-HS-HRP conjugate와 Ac4-NIV용액을 1:1로 혼합한 액을 각 well에 100 μ*l*씩 넣고 상온에서 1시간 처리하였다. 세척후 기질용액을 넣고 나머지 과정은 앞에서와 같이 행하였다.

교차반응 시험

PBST에 농도별로 희석한 Ac4-NIV 등 곰팡이독소(NIV, Ac4-NIV, DON, 3Ac-DON, 15Ac-DON, Ac3-DON, fusarenon-X, T-2, Ac-T-2)에 대한 특이항체의 반응성을 cdELISA로 분석하였다. 이들 독소에 대한 항체의 결합을 나타내는 교차반응의 정도는 항Ac4-NIV 항체에 대한 Ac4-NIV-HS-HRP의 결합을 50% 저해하는 Ac4-NIV의 농도를, Ac4-NIV-HS-HRP의 결합을 50% 저해하는 유사독소의 농도로 나눈 %값으로 나타내었다.

NIV의 회수율 분석

표준독소 NIV를 50% methanol 200 μ*l*에 용해시켜 30, 100, 300 및 1,000 ppb의 최종농도로 10 g의 분말 옥수수 시료에 각각 3반복씩 인위적으로 오염처리하고 하룻밤 건조기에서 건조시켰다. 이를 앞의 방법에서와 같이 용매추출 및 acetylation시킨 다음 최종적으로 PBST로 5배 희석하여 cdELISA를 실시하였다. 이때 옥수수유래 물질의 간섭효과는 cdELISA결과에 나쁜 영향을 미치므로, 이를 보정할 수 있도록 다음에서 얻은 표준곡선을 사용하였다. 즉, 오염되지 않은 옥수수 추출물을 시료의 경우와 같이 처리하고 최종적으로 PBST로 5배 희석한 다음 여기에 각 농도의 Ac4-NIV를 첨가한 후 cdELISA를 행하였다.

결과 및 고찰

항Ac4-NIV 항체의 생산과 그 특성

Ac4-NIV에 대한 항체를 얻기 위하여 Ac4-NIV-HS-BSA를 세 마리의 토끼에 수차례 면역하고 각 면역 1주일 뒤에 얻은 항혈청에 대하여 ELISA를 행하였다. 그 결과 항체가 가 가장 높게 나타난 1번 토끼, 4차 항혈청을 다음 실험에 사용하였다(Fig. 2). Protein A column으로 정제한 특이항체와 Ac4-NIV-HS-HRP를 이용하여 실험방법에 명시한 바와 같이 cdELISA의 조건을 확립하였다. Fig. 3의 표준곡선에서 보는 바와 같이 cdELISA에서 Ac4-NIV의 검출범위는 10~5,000 ppb로 나타났다. 이는 Teshima 등[6]이 확립한 RIA의 검출한계가 0.5 ng/m*l*인 점을 감안하면 다소 검출감도가 낮았다.

한편, 항NIV 항체를 이용하면 시료의 분석시 acetylation 등 복잡한 과정을 줄일 수 있는 잇점이 있을 것으로 생각되어 항NIV 항체의 생산을 시도하였다. 그러나, NIV-oxime-KLH conjugate를 면역원으로 사용하여 유기한 항체가 면역원과는 잘 반응하였으나 free NIV를 전혀 인식하지 못하여 분석에 활용할 수 없었다. 그 까닭은 분자구조상 OH기를 넷 가진 NIV는 친수성이 높아 NIV에 대한 특이항체의 유기가 어려웠던 때문으로 추측된다. 이를 뒷받침하는 간접

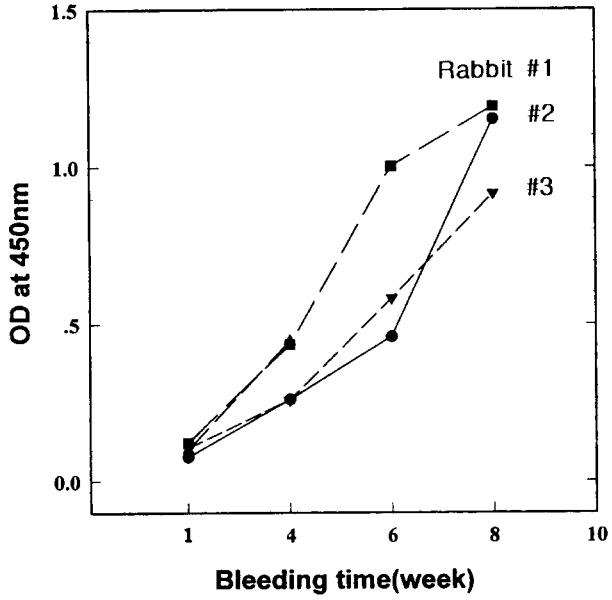


Fig. 2. Production of anti-tetraacetyl NIV antibodies by rabbits immunized with Ac4-NIV-HS-BSA on weeks 0, 3, 5, and 7, and bleeded one week after each immunization.

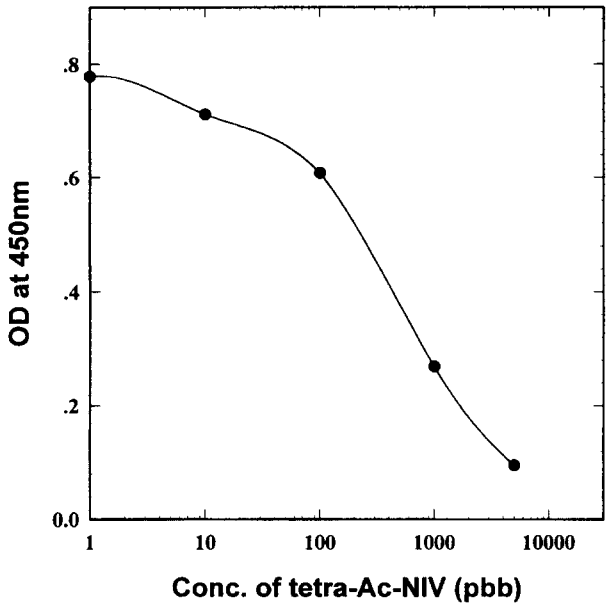


Fig. 3. Standard curve by cdELISA for Ac4-NIV.

적인 예로서 aflatoxin의 경우를 들 수 있는데, 강한 소수성을 가진 이 독소는 특이항체의 유기가 용이하며 그 ELISA의 검출감도도 높은 것으로 보고되었다.[10]

항Ac4-NIV 항체의 교차반응

NIV, Ac4-NIV, DON, 3Ac-DON, 15Ac-DON, Ac3-DON, fusarenon-X, T-2, Ac-T-2 등 NIV유도체들에 대한 특이항체의 교차반응을 cdELISA로 검토하였을 때, Ac4-NIV 및 Ac-T-2는 항체에 대한 Ac4-NIV-HS-HRP의 결합을 저해하였으며 각각의 IC50값(230, 330 ng/m*l*)으로 부터 그 교차반응율은 100, 70%로 나타났다(Fig. 3, Table 1). 그러나 다른 유도체의 경우는 교차반응율이 0.1% 이하로 거의 반응성을 보이지 않았다. 이러한 교차반응은 Teshima 등[6]의 경우와 유사한 경향을 보였으나, Ac3-DON에 대한 반응율이 2.2%로 나타난 Wang 등[8]의 경우보다는 양호하였다.

특이항체와 높은 반응성을 보인 Ac-T-2는 구조상 R_4를 제외한 R_1, R_2, R_3 위치가 모두 acetylation되어 있는 점으로 미루어 R_4의 위치는 항체의 인식에 덜 중요한 부위로 생각된다. 이는 아마도 면역원의 준비시 hapten인 Ac4-NIV가 carrier protein과 conjugation되는 부위(R_5)와 R_4가 인접하여

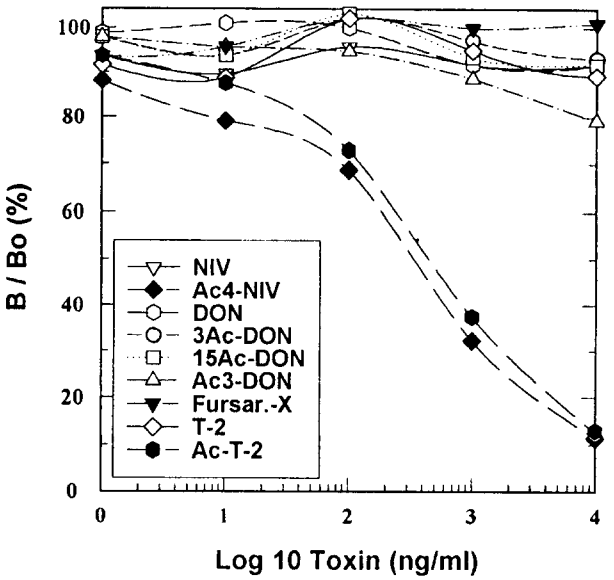


Fig. 4. Effect of NIV analogues on the binding of Ac4-NIV-HRP to specific antibody as determined by cdELISA. B/Bo means relative binding of Ac4-NIV-HRP in the presence of toxin.

Table 1. Cross-reactivity of specific antibody towards NIV and its derivatives as determined by cdELISA

Trichothecene	Reactivity (%)	Trichothecene	Reactivity (%)
NIV	0	Ac3-DON	<0.1
Ac4-NIV	100	Fusarenon-X	0
DON	0	T-2 toxin	70
3Ac-DON	0	Ac-T-2	0
15Ac-DON	0		

특이항체의 인식이 어려웠기 때문으로 추측된다. 한편, R_2, R_3 위치에만 acetylation되어 있는 T-2는 반응성이 매우 미약한 것으로 미루어 R_1의 위치가 특이항체의 인식에 중요한 부위임 것으로 추측된다. 또한, R_2를 제외한 R_1, R_3, R_4의 위치가 모두 acetylation된 Ac3-DON의 반응성은 매우 약한 것으로 미루어 R_2의 위치도 특이항체의 인식에 중요한 부위인 것으로 생각된다.

cdELISA에 의한 NIV의 회수율

본 연구에서 확립한 cdELISA의 신뢰성을 검토하기 위하여 시료중 회수율을 조사하였다. 실험방법에 명시한 바와 같이 NIV 표준품을 30, 100, 300, 1,000, 3,000 ng/g(ppb)의 최종농도로 오염시킨 옥수수 시료를 용매추출하고 acetylation 등의 과정을 거친 후 cdELISA를 행하여 NIV의 분석치를 구한 결과, 30 ppb의 처리군은 회수율이 극히 불안정하여 분석이 곤란하였으나 100 ppb 이상의 처리군에서는 각각 108, 143, 70, 24%(평균, 86%)로 나타났다(Table 2). 따라서, 오염농도의 증가에 따라 회수율이 떨어지는 문제가 있지만 오염농도 100~1,000 ppb의 범위내에서 그 회수율은 평균 107%로서 비교적 양호함을 알 수 있다.

이상과 같이 본 연구에서 다클론항체를 이용하여 개발한 ELISA는 농산물에 오염된 NIV 검출에 활용가능할 것으로 생각된다. 그러나 본 ELISA는 추출물의 acetylation후 NIV를 검출하는 방법이기 때문에, NIV 이외에 T-2 toxin와 같은 trichothecene독소도 acetylation 후에는 특이항체가 잘 인식하게 됨으로써 이들의 오염치가 합산된 분석결과를 얻을 소지가 있다. 그러므로 이를 개선하기 위하여는 Ikebuchi 등[7]의 경우처럼 특이성이 보다 우수한 단클론항체를 생산하여 이용하는 연구가 요구된다.

Table 2. Recovery rates of NIV from spiked corns as determined by cdELISA

Added, ng/g	Detected[1], ng/g	Recovery, %
100	108±21	108
300	430±82	143
1,000	699±105	70
3,000	720±46	24
Average		86 [107][2]

[1]Means of interassay (n=3)±SD
[2]Calculated between 100 and 1,000 ng/g

감사의 말

본 연구는 보건복지부의 '96년도 보건의료기술개발사업으로 수행된 결과의 일부이며 연구비 지원에 감사드립니다.

국문요약

Nivalenol(NIV)의 검출을 위한 효소면역측정법(ELISA)을 개발하기 위하여 tetraacetyl nivalenol(Ac4-NIV)에 대한 다클론항체를 생산하고 그 조건을 확립하였다. Ac4-NIV-hemisuccinate를 bovine serum albumin에 공유결합시킨 Ac4-NIV-HS-BSA를 Freund's adjuvant와 함께 수차례 토끼에 피하면역하였다. 가장 높은 항체가를 나타낸 항혈청으로 부터 정제한 항체와 Ac4-NIV-HS-HRP conjugate를 이용하여 직접 경합 ELISA(cdELISA)를 확립하였다. 그 표준곡선으로 부터 Ac4-NIV의 검출범위는 10~5,000 ng/ml(ppb)임을 알 수 있었다. 특이항체의 Ac4-NIV과 acetyl T-2에 대한 반 응성은 각각 100, 70%였으나, NIV, deoxynivalenol, 3-acetyl deoxynivalenol, 15-acetyl deoxynivalenol, triacetyl deoxynivalenol, fusarenon-X, T-2에 대한 반응성은 0.1% 이하로 극히 미약하였다. NIV를 인위적으로 오염시킨 옥수수시료를 70% acetonitrile로 추출하고 acetylation한 다음 cdELISA를 행하였을 때, 분석의 회수율은 100, 300, 1,000 ng/g(ppb)에서 각각 108, 143, and 70%(평균, 107%)로 나타났다.

참고문헌

1. Kang, H.J., Kim, J.C., Seo, J.A., Lee, Y.W. and Shon, D. H.: Contamination of *Fusarium* mycotoxins in corn sapmles imported from China. *Agric. Chem. Biotechnol.*, **37**, 385-391 (1994).
2. Tanaka, T., Hasegawa, A., Matsuki, Y., Ishii, K. and Ueno, Y.: Improved methodology for the simultaneous detection of the trichothecene mycotoxins deoxynivalenol and nivalenol in cereals. *Food Addit. Contam.*, **2**, 125-137 (1985).
3. Ichinoe, M., Kurata, H., Sugiura, Y. and Ueno, Y.: Chem-

otaxonomy of Gibberella zeae with special reference to production of trichothecenes and zearalenone. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 1364-1369 (1983).
4. Lee, U.S., Jang, H.S., Tanaka, T., Oh, Y.J., Cho, C.M. and Ueno, Y.: Effect of milling on decomposition of *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone in Korean wheat. *J. Agric. Food Chem.*, **35**, 126-129 (1987).
5. Ueno, Y.: General toxicology, pp. 135-146. *In* Ueno, Y. (ed.), *Trichothecenes-chemical, biological and toxicological aspects*. Kodansha Ltd., Tokyo (1983).
6. Teshima, R., Hirai, K., Sato, M., Ikebuchi, H., Ichinoe, M. and Terao, T.: Radioimmunoassay of nivalenol in barley. *Appl. and Environ. Microbiol.*, **56**, 764-768 (1990)
7. Ikebuchi, H., Teshima, R., Hirai, K, Sato, M., Ichinoe, M. and Terao, T.: Production and characterization of monoclonal antibodies to nivalenol tetraacetate and their application to enzyme-linked immunoassay of nivalenol. *Biol. Chem. Hopper-Seyler*, **371**, 31-36 (1990).
8. Wang, C. and Chu, F.S.: Production and Characterization of antibodies against nivalenol tetraacetate. *Appl. and Environ. Microbiol.* **57**, 1026-1030 (1991).
9. Habeeb, A.F.S.A.: Determination of amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid. *Anal. Biochem.*, **14**, 326-336 (1966).
10. Shon, D.H., Park, A.R., Seo, B.C., Kim, J.C., Lee, Y.W., Nam, Y.J. and Hawer, S.W.D.: Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of aflatoxin B1. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **20**, 225-232 (1992).