

효소면역측정법에 의한 우유중의 Aflatoxin M₁ 분석

손동화* · 임선희¹ · 이인원¹

한국식품개발연구원, 이화학연구소, ¹서울대학교 농업생명과학대학 농업생물소재연구센터

Detection of Aflatoxin M₁ in Cow's Milk by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Dong-Hwa Shon*, Sun-Hee Lim¹ and Yin-Won Lee¹. *Food Chemistry and Physics Division, Korean Food Research Institute, Songnam 463-420, Korea, ¹Research Center for New Bio-Materials in Agriculture, College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea* — For a survey of the occurrence of aflatoxin M₁ (AFM₁) in domestic cow's milk, we developed an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) system, and quantitated the toxin in cow's milk. In order to produce specific antibodies AFM₁ conjugated to bovine serum albumin (AFM₁-BSA) and Freund's adjuvant were immunized subcutaneously to rabbits. By use of the antiserum showing the highest titer and AFB₁-HRP conjugate, we established a competitive direct ELISA (cdELISA) for AFM₁ whose detection limit was 0.003 ppb. The cross-reactivities of the antiserum against aflatoxin M₁ M₂, B₁, B₂, G₁, G₂, B_{2a}, and G_{2a} were 100, 29.9, 25.0, 2.7, 13.0, 0.65, 0, and 0%, respectively. When the cdELISA was applied to the cow's milk spiked with AFM₁ and followed by cleanup with C₁₈ cartridge, the mean recovery of the assay was 104% (mean of CV, 6.4%) in the final concentration of 0.01~1 ppb (10~1,000 ppt). When cow's milk samples gathered from markets and farms were assayed by the cdELISA, the mean concentration and SD of AFM₁ was 80.4±55.0 ppt (n=64; range, 5.6~280 ppt).

Aflatoxin은 자연계에서 생성된 화합물중 가장 강력한 발암물질로서 세계적으로 고온, 다습한 열대나 아열대에서 생산되는 농산물에서의 검출빈도가 높은 곰팡이 독소이다. 이들 농산물을 원료로 한 사료를 가축이 섭취시, 독성과 오염도가 가장 높은 aflatoxin B₁(AFB₁)이 체내대사에 의하여 aflatoxin M₁(AFM₁)으로 전환되어 여전히 강한 독성을 나타낸다. 따라서 AFM₁이 오염된 우유 등의 축산물을 사람이 섭취하는 경우 심각한 위험을 초래할 수 있다. 특히 독소에 민감한 유아의 경우 치명적일 수 있다. 구미에서는 우유 중의 AFM₁ 오염 허용치를 법으로 정하여 시행하고 있는데, 가장 엄격한 스위스의 경우 0.01 ppb이며, 네덜란드 및 미국의 경우는 각각 0.05 ppb 및 0.5 ppb이다(1). 우리나라의 경우 식품에서 10 ppb로 허용기준치가 설정된 AFB₁과 달리 AFM₁은 허용기준치가 아직 설정되어 있지 않은 실정이다.

일반적으로 곰팡이독소의 검출은 주로 물리화학적 방법인 thin-layer chromatography(TLC), high-performance liquid chromatography(HPLC), gas chromatography-mass spectroscopy(GC-MS) 등을 이용하고 있으나, 이들 방법은 독소를 검출함에 있어서 검출감도가 낮거나 고가의 장비나 시약을 필요로 하며, 검출시 기술적인 전문성의 요구, 많은 분석 비용의 지출, 긴 검출시간 등의 문제로 효율적인 분석이 불가능하다(2). 한편, 근년에는 감도가 뛰어나고 신속, 간편하면서

또한 경제적인 AFM₁의 분석법인 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)를 곰팡이독소의 검출에 이용하기 시작하고 있다(3, 4). 국내에서는 항체를 이용한 농산물중, AFB₁의 고감도 신속검출법이 개발된 바 있으나(5, 6), AFM₁ 검출법은 아직 개발되지 않았다. 또한, 우유중 AFB₁의 오염현황에 관한 보고가 거의 없었다.

따라서, 본 연구에서는 ELISA에 의한 특이성과 검출감도가 우수한 AFM₁의 검출법을 개발하고, 이를 이용하여 시유 및 목장우유 중 AFM₁의 오염현황을 조사하였다.

재료 및 방법

재료

Aflatoxin M₁, M₂, B₁, B₂, G₁, G₂, B_{2a}, G_{2a} 등 표준독소 및 bovine serum albumin(BSA), horseradish peroxidase(HRP), carboxymethylamine hemihydrochloride, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDPC), Tween 20, goat anti-rabbit IgG-HRP conjugate, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline sulfonic acid) (ABTS) 등은 Sigma사의 제품을 사용하였다. Goat anti-rabbit IgG-HRP conjugate, Freund's complete adjuvant(FCA)와 Freund's incomplete adjuvant(FIA), 단백질 정량용 micro BCA kit(#23235), 항체정제용 protein A column(ImmunoPure Plus IgG Purification Kit, #44679)은 Pierce사로부터 구입하였으며, 기타의 시약과 유기용매는 GR 이상을 사용하였다. Sep-Pak C₁₈

*Corresponding author.

Key words: Aflatoxin M₁, ELISA, cow's milk

(ODS) cartridge는 Waters사의 제품(#51910)을, Microtiter plate는 Nunc사의 Maxisorp(#4-48812)을, microplate reader는 미국 BioTek사의 EL307C를 사용하였다. 실험동물인 New Zealand White 토끼는 한국실험동물연구소(경기도 수원시)에서 구입하였다.

Aflatoxin conjugate의 제조

면역원인 AFM₁-BSA과 cdELISA에 필요한 AFB₁-HRP는 Chu 등의 방법(3, 7, 8)에 준하여 만들었다. 후자의 경우를 중심으로 간단히 설명하면, 유기용매중에서 AFB₁에 carboxymethylamine을 처리하여 -COOH기를 부착시킨 다음, silica gel column을 통과시켜 AFB₁의 1번 탄소위치에 oxime이 형성된 AFB₁-1-(O-carboxymethyl)oxime를 TLC로 확인 후 회수하였다(7). 이를 효소인 HRP의 -NH₂기에 부착시키기 위하여 EDPC를 처리함으로써 amide bond를 형성시켰다(8). 반응이 끝난 후 phosphate buffered saline(PBS; 1.9 mM NaH₂PO₄, 8.1 mM Na₂HPO₄, 154 mM NaCl, pH 7.2)에 대한 투석 및 Sephadex G-25 column을 이용한 정제를 거쳐 AFB₁-HRP conjugate를 얻었으며 냉장보관하면서 사용하였다. 전자의 경우는 AFB₁과 HRP 대신에 AFM₁과 BSA를 사용한 점 이외에는 후자와 같은 방법으로 행하였다. Conjugate의 단백질 농도는 BCA kit를 이용하여 구하였다. 단백질 및 효소에 AFM₁ 및 AFB₁이 얼마나 결합했는지를 알아보기 위하여 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid(TNBS) 법으로 amino기를 정량하였다(9).

항혈청의 생산

AFB₁에 대한 특이항체를 생산하기 위하여 PBS에 용해된 AFM₁-BSA를 마리당 500 µg씩 FCA와 함께 동량비로 유탁액을 잘 만들어 토끼에 피하주사하였다. 이후 2~3주일 간격으로 FIA와 함께 500 µg씩 3회 추가면역하고, 면역 1주일 후에 각각 귀 정맥으로부터 채혈하였다. 채혈후 3시간 가량 실온에 방치하여 혈액이 응고된 다음, 원심분리(3,000×g, 10분)하여 항혈청을 분리하고 0.02% NaN₃를 첨가하였다(10).

효소면역측정법(ELISA)

시료중 AFM₁의 농도 측정을 위하여 확립한, 직접법에 의한 경쟁적 효소면역측정법(competitive direct ELISA, cdELISA)은 다음과 같이 행하였다. Coating buffer(0.02M tris, 0.15M NaCl, pH 9.0)에 1/1,000로 희석한 항혈청 용액 100 µl을 microplate의 well에 채우고 4°C에서 하룻밤 방치한 후, wash buffer(0.02M tris, 0.15M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.4) 150 µl로 3회 세척하였다. 다음으로 wash buffer로 1/10 희석한 AFB₁-HRP와 aflatoxin 용액을 1:1로 혼합 후 각 well에

100 µl씩 넣고 상온에서 한시간 처리한 후 wash buffer로 3회 세척한 다음, 기질 용액(0.1% ABTS, 0.06M citric acid, 0.077M Na₂HPO₄, pH 4.0, 0.02% hydrogen peroxide 사용전 첨가) 100 µl를 넣고 상온에서 30분간 방치하여 발색시킨 다음 반응정지액(0.1% sodium azide) 100 µl를 첨가하였다. Microplate reader로 파장 405 nm에서 각 well의 흡광도를 측정하였다. 각 시료당 3개씩의 well을 사용하여 얻은 흡광도의 평균값으로 분석하였다.

항혈청의 교차반응 시험

항체의 특이성을 조사하기 위하여 유사독소에 대한 항 AFM₁ 항혈청의 교차반응을 cdELISA로 분석하였다. Wash buffer에 농도별로 희석한 유사독소(M₂, B₁, B₂, G₁, G₂, B_{2a} 및 G_{2a})를 AFM₁ 대신에 사용하여 ELISA를 행하였다. 교차반응의 정도는 항 AFM₁ 항체에 대한 AFM₁-HRP의 결합을 50% 저해하는 AFM₁의 농도를, AFM₁-HRP의 결합을 50% 저해하는 유사독소의 농도로 나눈 % 값으로 나타내었다.

ELISA에 의한 AFM₁의 회수율 분석

우유중 AFM₁의 분석시 분석의 신뢰성을 검증하기 위하여 인위적인 오염후 ELISA 분석을 실시하였다. MeOH 10 ml과 증류수 10 ml로 전처리한 C₁₈ cartridge에 시유를 통과시켜 모은 액을 AFM₁이 전혀 오염되지 않은 우유로 하여 사용하였다. 여기에 CH₃CN에 용해시킨 AFM₁을, 최종농도 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1 ppb 되게 3반복하여 각각 오염시키고 다음과 같은 방법으로 실험하였다(1). 즉 우유시료 10 ml을 증류수 15 ml로 희석하여 잘 교반한 후 전처리된 C₁₈ cartridge를 통과시켰다. 10 ml의 증류수로 세척한 후 다시 10 ml의 n-hexane으로 세척하였다. 최종적으로 C₁₈ cartridge에 포집된 AFM₁을 5% acetone(v/v, in CH₂Cl₂) 2 ml로 용출시켜 분리하였다. 이때 유속은 초당 한 방울로 유지하였다. 최종 분리한 AFM₁ 용출용액은 질소가스를 이용하여 증발건조하였다. 이를 wash buffer에 재용해시켜 cdELISA에 사용하였다.

우유중 AFM₁의 분석

우유중 자연오염된 AFM₁을 cdELISA로 분석을 위하여 시유와 목장 우유를 수집하였다. 시유는 서울의 편의점에서 6개 회사, 15 제품을 구입하였다. 목장 우유는 수원, 용인, 병점 등 경기도 일원의 49개 목장에서 생산된 신선한 원유를 약 50 ml씩, 수집하여 냉장 보관하였다. 시유는 위의 방법에 따라 C₁₈ cartridge로 세척후 cdELISA로 분석하였으나, 목장우유는 3,000×g에서 10분간 원심분리하여 유지방을 제거한 후 같은 방법으로 행하였다.

결과 및 고찰

Aflatoxin conjugate의 준비

면역원과 cdELISA의 경합반응에 사용하기 위해 '방법'에 명시한 바와 같이 AFM₁-BSA 및 AFB₁-HRP conjugate를 제조하였다. 특히, AFM₁-HRP에는 hapten인 AFB₁의 유도체가 미량이라도 존재하면 ELISA의 검출감도를 낮추게 되므로, 이를 거의 완전히 제거하기 위하여 투석이 끝난 AFB₁-HRP 용액을 Sephadex G-25 column으로 한번 더 처리하였다. 면역원인 AFM₁-BSA은 AFM₁에 대한 효과적인 항체유기를 위하여 많은 수의 hapten이 carrier인 BSA에 결합될 수록 좋은데, 그 결합비율을 구하기 위해 각 conjugate 용액의 단백질농도를 정량하고, TNBS법(9)으로 free amino group의 수를 분석하여 각 conjugate 분자에 결합된 AFM₁ 및 AFB₁의 평균 갯수를 구하였다. 그 결과 BSA 한 분자당 약 10개의 amino기가 AFM₁에 결합된 것으로 나타났다(data 생략).

특이항체의 교차반응

AFM₁-BSA를 4차례 면역한 3마리의 토끼에서 얻은 각각의 항혈청으로 ELISA를 행한 결과 모든 토끼에서 AFM₁에 대해 특이적으로 결합하는 항 AFM₁ IgG 항체가 생성되었음을 확인할 수 있었으며, 그중에서도 1번 토끼의 4차 면역후 가장 높은 항체농도를 보였다(data 생략). 따라서 이 항혈청을 중심으로 항체특성을 조사하였다.

항 AFM₁ 항체의 특성을 조사하기 위하여 aflatoxin의 유도체들에 대한 교차반응을 cdELISA로 알아보았다. 그 결과 Fig. 1에 나타난 바와 같이 항체에 대한 AFB₁-HRP의 결합을 50% 저해하는 aflatoxin M₁, M₂, B₁, B₂,

G₁ 및 G₂의 농도는 각각 0.35, 1.17, 1.4, 13, 2.7 및 54 ng/ml이었으며, 그 교차반응율은 각각 100, 29.9, 25.0, 2.7, 13.0 및 0.65%이었다(Table 1). 또한, 특이항체는 B_{2a}와 G_{2a}에 대하여 교차반응하지 않았다. Hapten으로 사용한 AFM₁은 AFB₁과 그 구조상 9a 탄소 위치에서 -OH기 및 -H기의 차이지만 생산된 특이항체는 AFM₁의 분석에만 적합함을 알 수 있었다. 이와 같이, 생산한 특이항체는 기존의 보고와 비교시 AFM₁에 특이성이 강하거나 비슷한 것으로 나타났다(4, 11-14).

cdELISA의 검출감도

항 AFM₁ 항혈청과 AFB₁-HRP를 사용하여 AFM₁에 대한 cdELISA의 분석조건을 확립하고 작성한 표

Table 1. Cross-reactivity of AFM₁ and its derivatives with anti-AFM₁ antibodies as determined by cdELISA

| Aflatoxin | Toxin to inhibit 50% Ab binding (ng/ml) | Cross-reactivity ¹ (%) |
|-------------------|---|-----------------------------------|
| AFM ₁ | 0.35 | 100.0 |
| AFM ₂ | 1.17 | 29.9 |
| AFB ₁ | 1.40 | 25.0 |
| AFB ₂ | 13.0 | 2.7 |
| AFG ₁ | 2.7 | 13.0 |
| AFG ₂ | 54.0 | 0.65 |
| AFB _{2a} | N.D. ² | 0 |
| AFG _{2a} | N.D. ² | 0 |

¹AFM₁ conc. to inhibit 50% binding of anti-AFM₁ Ab / Toxin conc. to inhibit 50% binding of anti-AFM₁ Ab × 100
²Too high to detect

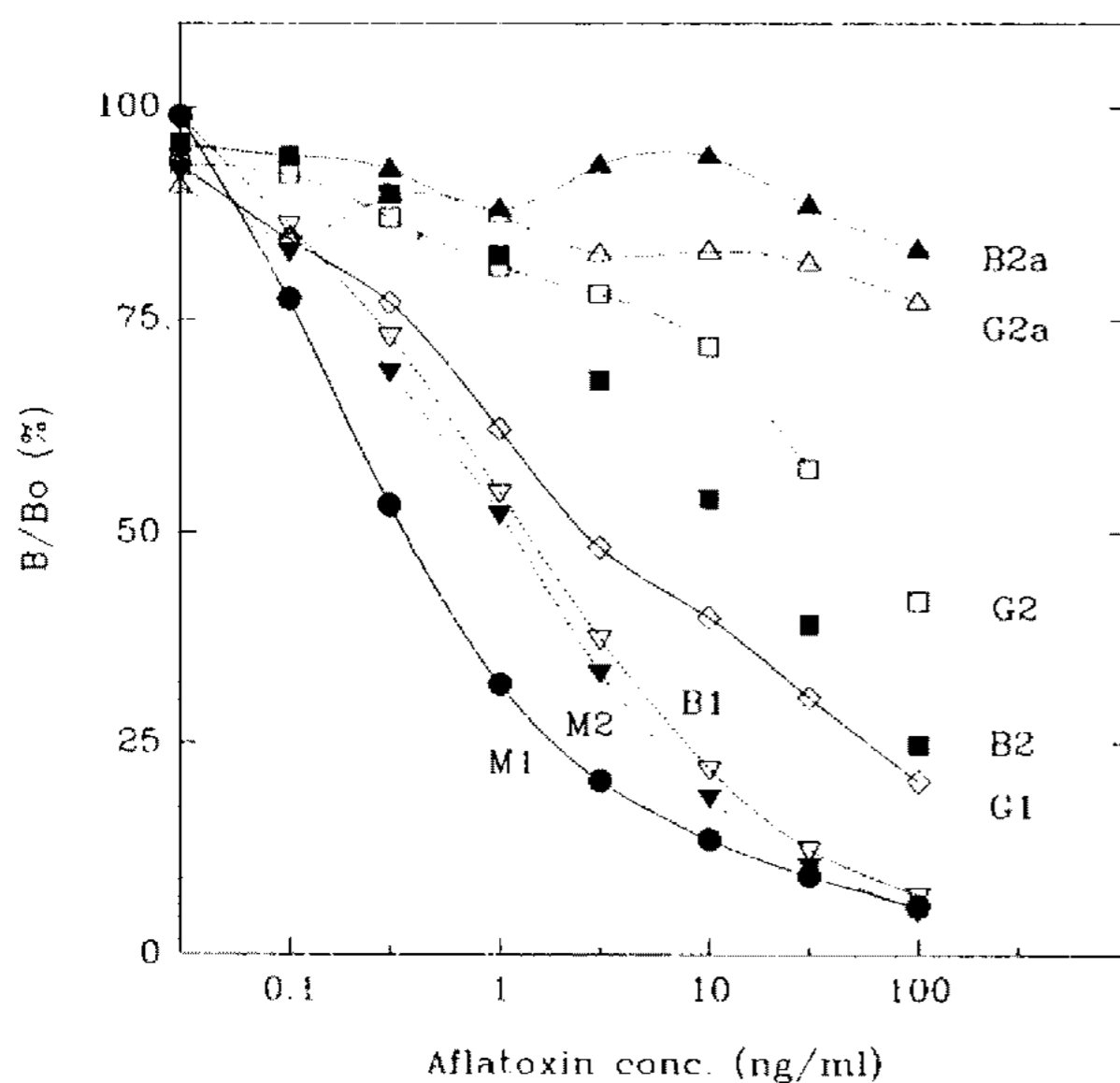


Fig. 1. Effect of different aflatoxins on the binding of AFB₁-HRP to anti-AFM₁ antibodies.

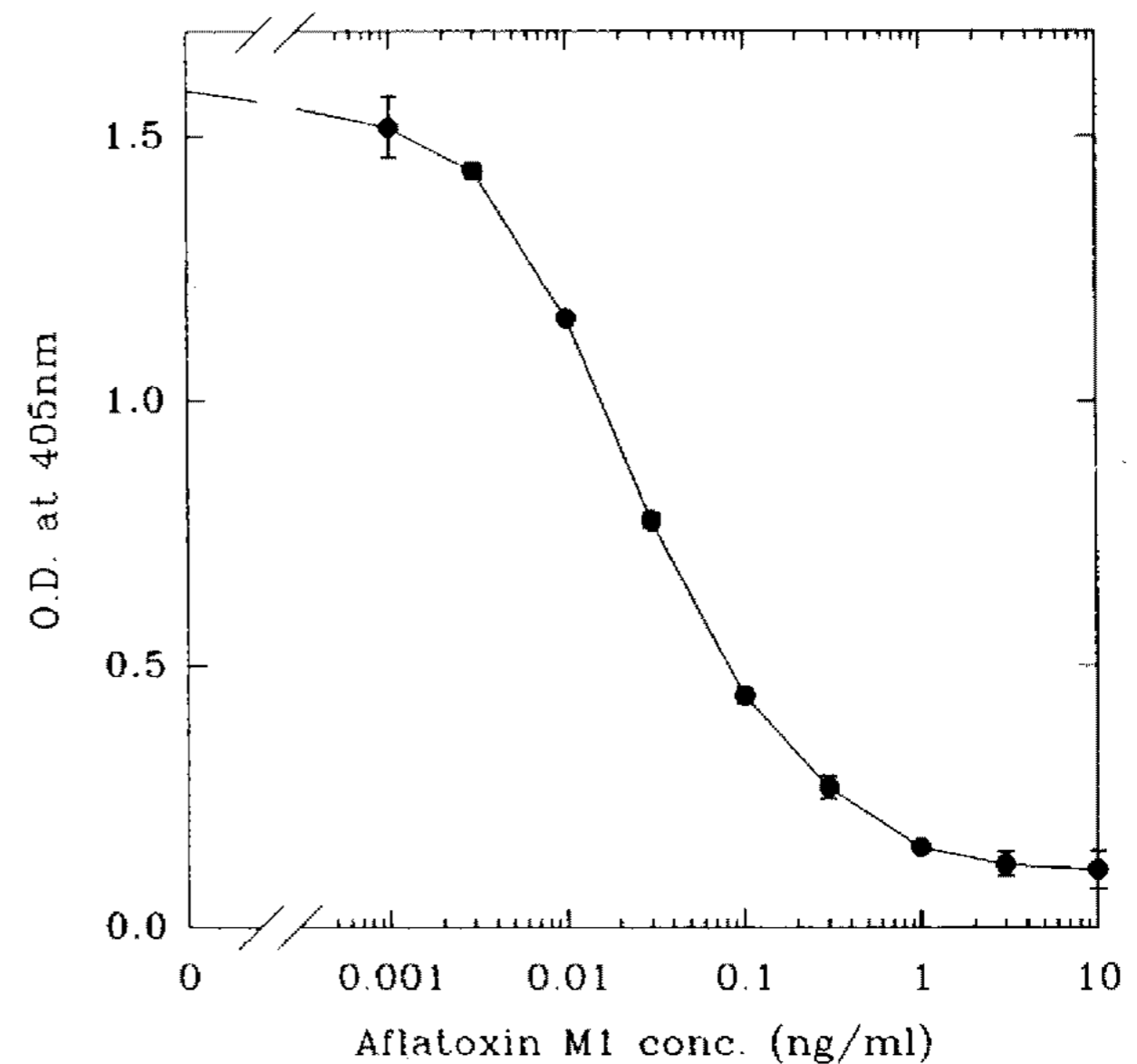


Fig. 2. Standard curve by competitive direct ELISA for AFM₁.

Each point and bar represents an average of 3 determinations and the SD.

Table 2. Recovery of aflatoxin M₁ by cdELISA from artificially contaminated cow's milk

| AFM ₁ added (pg/ml) | Detected ¹ (pg/ml) | Recovery (%) |
|--------------------------------|-------------------------------|---------------------------|
| 10 | 13.4 ± 0.6 (4.5) | 134 |
| 30 | 27.9 ± 1.4 (4.9) | 93.1 |
| 100 | 88.7 ± 6.6 (7.4) | 88.7 |
| 300 | 300 ± 28.2 (9.4) | 100 |
| 1,000 | 1060 ± 60 (5.7) | 106 |
| Mean of CV, % | (6.4) [6.9] ² | |
| Overall recovery | | 104.4 [97.0] ² |
| SD | | 16.0 [6.6] |
| Mean CV, % | | 15.3 [6.8] |

¹Mean of interassay (n=3) ± SD (CV, %)²Calculated between 30 and 1,000 pg/ml**Table 3. Natural occurrence of aflatoxin M₁ in commercial cow's milk as determined by cdELISA**

| Code no | Aflatoxin M ₁ (pg/ml) |
|------------------|----------------------------------|
| CM ₁ | 280 |
| CM ₂ | 108 |
| CM ₃ | 180 |
| CM ₄ | 132 |
| CM ₅ | 68 |
| CM ₆ | 116 |
| CM ₇ | 136 |
| CM ₈ | 148 |
| CM ₉ | 230 |
| CM ₁₀ | 196 |
| CM ₁₁ | 48 |
| CM ₁₂ | 64 |
| CM ₁₃ | 60 |
| CM ₁₄ | 100 |
| CM ₁₅ | 94 |
| No. of samples | 15 |
| Mean ± S.D. | 130.7 ± 64.5 |
| Range | 48 ~ 280 |

준곡선은 Fig. 2와 같다. 여기에서 AFM₁의 검출범위는 0.003~0.3 ppb로 검출 감도가 매우 양호함을 알 수 있다. 또한 이 경우에 AFM₁-HRP 대신에 AFB₁-HRP를 사용하였는데, 이는 항 AFM₁ 항체가 AFB₁(AFB₁-HRP)에도 반응이 가능하고, AFB₁은 AFM₁보다 비교적 값 싸게 다량 확보할 수 있기 때문이었다. 그러나, 이 항체가 AFB₁에 대한 결합력이 약하므로 비교적 높은 농도의 AFB₁-HRP를 요하는 단점이 있었다.

결국 본 연구에서 확립한 다클론항체에 의한 cdELISA는 그 검출한계가 0.003 ppb로, 세계에서 규제가

Table 4. Natural occurrence of AFM₁ in raw cow's milk as determined by cdELISA

| Code no | AFM ₁ (pg/ml) |
|------------------|--------------------------|
| RM ₁ | 26 |
| RM ₂ | 38 |
| RM ₃ | 50 |
| RM ₄ | 11.6 |
| RM ₅ | 100 |
| RM ₆ | 9.0 |
| RM ₇ | 13.6 |
| RM ₈ | 18.8 |
| RM ₉ | 18.8 |
| RM ₁₀ | 40 |
| RM ₁₁ | 10 |
| RM ₁₂ | 9.6 |
| RM ₁₃ | 17.6 |
| RM ₁₄ | 120 |
| RM ₁₅ | 94 |
| RM ₁₆ | 156 |
| RM ₁₇ | 52 |
| RM ₁₈ | 100 |
| RM ₁₉ | 50 |
| RM ₂₀ | 44 |
| RM ₂₁ | 84 |
| RM ₂₂ | 16.4 |
| RM ₂₃ | 84 |
| RM ₂₄ | 132 |
| RM ₂₅ | 108 |
| RM ₂₆ | 90 |
| RM ₂₇ | 88 |
| RM ₂₈ | 144 |
| RM ₂₉ | 100 |
| RM ₃₀ | 60 |
| RM ₃₁ | 120 |
| RM ₃₂ | 74 |
| RM ₃₃ | 120 |
| RM ₃₄ | 128 |
| RM ₃₅ | 7.2 |
| RM ₃₆ | 88 |
| RM ₃₇ | 68 |
| RM ₃₈ | 5.6 |
| RM ₃₉ | 52 |
| RM ₄₀ | 48 |
| RM ₄₁ | 42 |
| RM ₄₂ | 104 |
| RM ₄₃ | 92 |
| RM ₄₄ | 60 |
| RM ₄₅ | 32 |
| RM ₄₆ | 40 |
| RM ₄₇ | 76 |
| RM ₄₈ | 46 |
| RM ₄₉ | 96 |
| No. of samples | 49 |
| Mean ± S.D. | 65.0 ± 40.8 |
| Range | 5.6 ~ 156 |

가장 엄격한 스위스의 경우 우유에는 AFM₁ 허용농도인 0.01 ppb(1)보다 높아 매우 우수한 검출감도를 나타내었다(4, 11-14).

ELISA에 의한 AFM₁의 회수율

본 연구에서 확립한 cdELISA에 의한 분석의 신뢰성을 검증하기 위하여, 실험방법에 명시한 바와 같이 AFM₁을 우유를 인위적으로 첨가하여 0.01~1 ppb까지 오염시킨 뒤 C₁₈ cartridge로 세척한 다음 cdELISA에 의한 회수율을 구하였다. 그 결과 전체적으로 평균회수율 104.4%, 각 농도별 coefficient of variation(CV)의 평균값은 6.4%로 나타나 양호한 분석회수율을 보였다(Table 2). 다만, 0.01 ppb의 저농도에서는 다소 높은 회수율(134%)을 나타내었다.

또한, 본 연구에서 C₁₈ cartridge에 의한 세척후 회수한 AFM₁을 buffer에 재용해함으로써, 원래의 우유시료중 AFM₁의 농도보다 5배 농축된 액을 분석에 사용하였다. 따라서, 검출감도는 더욱 높일 수 있는 잇점이 있으나, 세척 등의 과정을 거쳐야 하는 불편이 있으므로 이 점을 개선하기 위한 추가적인 검토가 필요하다고 생각한다. 또한 우유 이외의 유가공품중에 오염된 AFM₁의 분석을 위한 신뢰성 검증을 할 필요가 있다고 생각한다.

우유중 AFM₁의 오염현황

본 연구에서 확립한 cdELISA를 활용하여 실제 우유시료중 AFM₁의 오염현황을 분석하였다. 그 결과 분석에 사용한 전체시료의 오염평균치 및 SD는 80.4±55.0 ppt (n=64 ; 범위, 5.6~280 ppt)이었다. 또한 시유 15점은 130.7±64.5 ppt(범위, 48~280 ppt)의 오염치를, 목장우유(원유) 49점은 65.0±40.8 ppt(범위, 5.6~156 ppt)의 오염치를 각각 나타내었다(Table 3, 4). 여기에서 시유는 원유보다 AFM₁이 2배 가량 높게 오염된 것으로 나타났으나, 이는 실험방법상의 차이이기 보다 시료수집상의 문제로 판단된다. 아문든, 전체 64 시료중 AFM₁의 허용기준이 가장 엄격한 스위스의 기준치(10 ppt)보다 낮은 것은 5점에 불과하였으나, 미국 FDA의 허용기준치(500 ppt=0.5 ppb)보다는 모두 낮았다.

이상의 결과에서 국내산 우유중 AFM₁의 오염정도는 그다지 문제가 없는 것으로 생각된다. 그러나, 국민건강보건의 차원에서 독성실험이 뒷받침된 자체허용기준치를 설정할 필요가 있으며, 본 연구에서 개발한 cdELISA를 활용하여 주기적인 AFM₁의 오염현황을 분석할 필요가 있다고 생각한다.

요 약

국내산 우유중 aflatoxin M₁(AFM₁)의 오염현황을 조사하기 위하여, 효소면역측정법(ELISA)을 개발하고 이

를 이용한 독소의 정량을 행하였다. 항체의 생산을 위하여 AFM₁-bovine serum albumin 결합체를 Freund's adjuvant와 함께 토끼에 피하주사하여 면역하였다. 가장 높은 항체역가를 보인 항혈청과 AFB₁-horseradish peroxidase 결합체를 이용하여 직접법에 의한 경쟁적 효소면역측정법(competitive direct ELISA ; cdELISA)의 조건을 확립하였으며, 그 검출한계는 0.003 ppb로 나타났다. 또한 유사독소에 대한 교차반응율은 aflatoxin M₁, M₂, B₁, B₂, G₁, G₂, B_{2a}, and G_{2a}에 대하여 각각 100, 29.9, 25.0, 2.7, 13.0, 0.65, 0 및 0%이었다. 다음으로, AFM₁을 인위적으로 오염시킨 우유를 C₁₈ cartridge로 세척후 cdELISA로 분석하였을 때, 0.01~1 ppb(10~1,000 ppt)의 범위에서 그 회수율의 평균은 104%(CV의 평균, 6.4%)로 나타났다. 시유 및 목장우유를 대상으로 AFM₁의 오염현황을 cdELISA로 조사하였을 때, 평균 오염도는 80.4±55.0 ppt(n=64 ; range, 5.6~280 ppt)이었다.

감사의 말

본 연구는 과학기술처의 '94 국책연구개발사업(UR대응농업기술개발사업)으로 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다. 또한, 원유시료를 제공하여 주신 (주)서울우유와 (주)매일유업에 감사드립니다.

참고문헌

1. Qian, G.S., P. Yasei, and G.C. Yang. 1984. Rapid extraction and detection of aflatoxin M₁ in cow's milk by high-performance liquid chromatography and radioimmunoassay. *Anal. Chem.* **56**: 2079-2080.
2. Park, D.L. and A.E. Pohland. 1986. Foodborne microorganisms and their toxins: Developing methodology, Pierson, M.D. and N.J. Stern eds. *Marcel Dekker*, Pp. 425-438.
3. Harder, W.O. and F.S. Chu. 1979. Production and characterization of antibody against aflatoxin M₁. *Experientia* **35**: 104-1107.
4. Hu, W.J., N. Woychick, and F.S. Chu. 1984. ELISA of picogram quantities of aflatoxin M₁ in urine and milk. *J. Food Prot.* **47**: 126-127.
5. 손동화, 박애란, 김진철, 서병철, 이인원, 허우덕, 남영중. 1992. Aflatoxin B₁의 검출을 위한 효소면역측정법의 개발. *한국산업미생물학회지* **20**: 225-232.
6. 손동화, 박애란, 이인원. 1992. 수입곡물 중의 Aflatoxin B₁ 검출을 위한 효소면역측정법의 평가. *한국산업미생물학회지* **20**: 355-361.
7. Chu, F.S., M.T.S. Hsia, and P.S. Sun. 1977. Preparation and characterization of aflatoxin B₁-1-(O-carboxymethyl)oxime. *JAOAC* **60**: 791-794.
8. Chu, F.S. and I. Ueno. 1977. Productin of antibody against aflatoxin B₁. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**: 1125-1128.

9. Habeeb, A.F. 1966. Determination of amino groups proteins by trinitrobenzenesulfonic acid. *Appl. biochem.* **14**: 326-336.
10. 日本生化学會 編. 1986. 免疫生化学研究所: 生化学实验講座, Vol. 5. 東京化学同人, 東京. Pp. 1-83.
11. Maertlbauer, E. and G. Terplan. 1985. Ein hochempfindlicher heterologer enzymimmunologischer Nachweis von Aflatoxin M₁ in Milch and Milchpulver. *Arch. Lebensmittelhyg.* **36**: 53-55.
12. Mortimer, D.N., J. Gilbert, and M.J. Shepherd. 1987. Rapid and highly sensitive analysis of aflatoxin M₁ in liquid and powdered milks using an affinity column cleanup. *J. Chromatogr.* **407**: 393-398.
13. Pestka, J.J., Y.K. Li, W.O. Harder, and F.S. Chu. 1981. Comparison of radioimmunoassay and an enzyme-linked immunosorbent assay for the analysis of aflatoxin M₁ in milk. *JAOAC* **64**: 294-301.
14. Woychok, N.A., R.D. Hinsdill, and F.S. Chu. 1984. Production and characterization of monoclonal antibodies against aflatoxin M₁. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 1096-1099.

(Received 10 December 1995)