

## 곡류 중 아플라톡신 B1 신속 검출용 간이진단키트의 개발

최선미<sup>1</sup> · 김기영 · 이상대 · 문지혜 · 엄애선<sup>1\*</sup>

농촌진흥청 국립농업과학원 농업공학부, <sup>1</sup>한양대학교 식품영양학과

### Development of Rapid Detection Kit for Aflatoxin B1 in Cereals

Sunmi Choi<sup>1</sup>, Giyoung Kim, Sangdae Lee, Jihea Moon, and Aeson Om<sup>1\*</sup>

Department of Agricultural Engineering, National Academy of Agricultural Science,  
Rural Development Administration.

<sup>1</sup>Department of Food and Nutrition, Hanyang University

#### Abstract

The aim of this study is to develop the one dot rapid detection kit that meets the limit of detection (LOD) of KFDA (10 µg/kg) for Aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>). The fabrication process of the one dot rapid detection kit, such as gold nanoparticle and AFB<sub>1</sub>-BSA conjugation, and AFB<sub>1</sub>-polyclonal antibody concentration was optimized. Fabricated rapid detection kits were tested with the standard AFB<sub>1</sub> solutions and the solutions extracted from contaminated maize samples. The LOD in the standard AFB<sub>1</sub> solution and extracted AFB<sub>1</sub> solution was 5 µg/kg for both. This result is lower than the LOD of KFDA in food (10 µg/kg) and satisfies the LOD of EU (2-12 µg/kg) and Japan (10 µg/kg) in food.

**Key words:** Aflatoxin B<sub>1</sub>, Rapid detection kit, Cereals, Corn

#### 서 론

FTA 등 국제 교역의 활성화와 국민 식생활 향상으로 인해 식품 안전성에 대한 관심이 높아지고 있다. 일반적으로 식품의 안전성을 위협하는 요인으로는 미생물을 포함한 생물학적 요인과 잔류항생물질, 농약 및 중금속 등을 포함한 화학적 요인으로 분류할 수 있다. 그 중에서 생물학적 요인에 속하는 미생물 오염은 특정 유해곰팡이에 의해 생성되는 2차 대사산물인 곰팡이독소에 의한 오염으로 사람과 가축에게 급성 또는 만성 질환을 일으키고 경우에 따라 죽음에 이르게 하는 등 광범위한 문제를 발생시키고 있다 (Bennett, 1987; Schuh, 1997). Aflatoxin(AF)은 *Aspergillus flavus* 등의 자연계에 널리 분포하고 있는 곰팡이독소 중 하나로 다양한 역학 결과를 토대로 인간과 가축에게 간암 등의 치명적인 독성을 나타낸다고 알려져 있다(Campbell & Hayes, 1976). 현재 국제암연구소(International Agency for Research on Cancer, IARC)는 AF를 인체발암성이 확인된 Group 1으로 분류하고 있다(Ammida et al., 2004).

가장 대표적인 AF에는 Aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> 등이 있으며 이 중에서 Aflatoxin B<sub>1</sub>(AFB<sub>1</sub>)은 원료 식품 및 그 가공품 내에서 가장 빈번하게 발견되며 가장 강력한 독성을 나타내는 것으로 알려져 있다(Hussein & Brasel, 2001; Park, 2006). AFB<sub>1</sub>은 주로 쌀, 옥수수 등과 같은 곡류와 견과류에서 잘 생성되며 열에 안정하여 조리나 식품 가공 상의 가열처리 이후에도 독성이 남아있는 문제가 있다(Bhatnagar et al., 2002; Blesa et al., 2003). 이로 인해 세계 여러 나라에서는 아플라톡신에 대한 기준 및 규격이 설정되어 있으며 AFB<sub>1</sub> 또는 AF의 양으로 관리한다(Jang et al., 2007).

식품에 존재하는 AFB<sub>1</sub>의 검출을 위해 가장 널리 이용되고 있는 방법으로는 크로마토그래피법과 효소면역분석법(ELISA) 등이 있다. 이러한 방법들은 사용법이 복잡하고 기기가 고가이며 전용 실험실과 전문 인력을 필요로 하는 등의 문제점이 있다. 따라서 AFB<sub>1</sub>을 정확하고 신속하게 검출할 수 있는 간단한 측정법이 연구되고 있다(Hong, 2011). 이 중 하나인 간이진단키트법은 크로마토그래피법과 효소면역분석법(ELISA)을 기본으로 한 분석방법으로 전문가가 아니더라도 10~30 분 이내에 AFB<sub>1</sub>의 검출유무를 육안으로 판독할 수 있다(Babacan et al., 2002; Xiluan et al., 2006; Bazin et al., 2010; Hong, 2011). 또한 시료 속 대상물질의 존재유무를 판정하는 방법으로 간편성, 편리성,

\*Corresponding author: Aeson Om, Department of Food and Nutrition, College of Human Ecology, Hanyang University, 222 Wangsimni-ro, Seongdong-gu, Seoul 133-791, Korea  
Tel: +82-2-2220-1203; Fax: +82-2-2220-1856  
E-mail: [aesonom@hanyang.ac.kr](mailto:aesonom@hanyang.ac.kr)  
Received May 14, 2013; revised August 20, 2013; accepted August 23, 2013

경제성을 갖추고 있다(Choi et al., 2012).

본 연구는 국내 유통 중인 옥수수를 대상으로 곡류에서 가장 빈번하게 발생하고 있는 곰팡이독소 중에서 가장 강력한 독성을 나타내는 AFB1을 신속검출법인 간이진단키트를 이용하여 검출하고자 하였다. 검출 방법은 표준선과 검출선을 이용하는 기존 간이진단키트 검출법 대신에 새로운 간이진단키트 분석법인 one-dot 간이진단키트와 이미지분석 시스템을 이용하였다. 새로운 검출법을 적용한 간이진단키트를 이용하여 AFB1을 국내 식품 허용기준(10 µg/kg)이하로 검출할 수 있는 간이진단키트를 제작하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

AFB1의 검출유무를 색으로 나타내기 위해 사용되는 표지자는 40 nm 금나노입자를 Bioassay works, LLC.(Fiamsville, MD, USA) 이용하였으며 금나노입자와 결합하는 AFB1-bovine serum albumin(BSA)와 검출부에 사용되는 항체인 Mouse Polyclonal AFB1 antibody(AFB1-PAb)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, Mo, USA)에서 구입하였다. 교차반응 실험을 위해 사용된 항체인 Rabbit Polyclonal OTA antibody는 abcam(Cambridge, MA, USA)에서 구입하였으며 시료패드, 결합패드, 니트로셀룰로오스 막, 흡수 패드는 Millipore Co.(Billerica, MA, USA)에서 구입하였다. 간이진단키트 제작을 위한 사용된 전처리 시약인 Tween-20은 MB Ceil(Los Angeles, CA, USA)에서 구입하였으며 자당(sucrose)과 인산완충생리식염수(phosphate buffered saline, PBS)를 비롯한 기타 시약은 Sigma Chemical co.의 제품을 사용하였다.

### 간이진단키트의 재료 및 구성

간이진단키트는 Fig. 1과 같이 시료패드, 결합패드, 니트로셀룰로오스막, 흡수 패드로 구성된다(Kim et al., 2011). 간이진단키트의 전처리 조건은 Moon et al.(2012a)의 방법을 참고하였다.

### 표준 용액을 이용한 AFB1 검출

AFB1 표준용액은 10% 메탄올이 첨가된 0.01M PBS

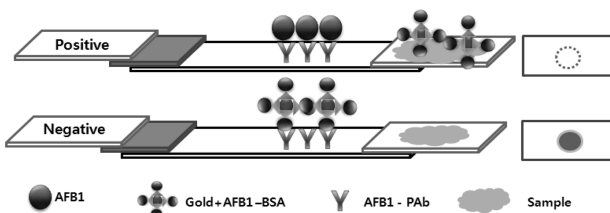


Fig. 1. Schematic diagram of the one-dot rapid detection kit.

(pH7.4)에 농도별로 각각 희석하여 0, 5, 10, 100, 1,000 µg/kg로 제작하였다. 금나노입자와 AFB1-BSA 중합체는 pH 8.8 조건에서 제작하였다(Moon et al., 2012b).

### 옥수수 추출물을 이용한 AFB1 검출

건조옥수수는 수원 시내 소매점에서 육안으로 하자가 없는 상품으로 구입 후 4°C에서 냉장 보관하였다. 옥수수 추출물은 우선 건조옥수수 500 g을 믹서를 이용하여 곱게 분쇄한 다음 메탄올과 PBS(5:95, v:v)으로 제작된 125 ml 추출용액에 분쇄된 건조옥수수 25 g을 넣고 잘 섞어주었다. 그 다음 추출용액과 혼합된 건조옥수수는 800 rpm의 균질기에서 2시간 동안 추출하였으며 추출물은 5,000 rpm에서 20분간 원심분리를 한 후 상층액을 옥수수 추출물로 이용하였다. AFB1은 옥수수 추출물에 농도별로 희석하여 0, 5, 10, 100, 1,000 µg/kg 표준용액을 제작하여 준비하였다. 준비된 용액은 AFB1 검출용 시료로 사용하였다.

또한, Ochratoxin A(OTA) 용액은 옥수수 추출물에 농도별로 OTA를 희석하여 0, 5, 10, 100, 1,000 µg/kg로 제작하여 준비된 AFB1 검출용 간이진단키트에 분주하여 교차반응성을 확인하였다.

### 간이진단키트의 이미지분석

간이진단키트의 객관적인 분석과 검출성능의 향상을 위해 탁상형 스캐너(CanoScan LiDE 200, Canon USA Inc., Melville, NY, USA)를 이용하여 획득한 이미지를 이미지분석 프로그램인 ImageJ(NIH, USA)를 이용하여 256 단계의 명암을 갖는 흑백 이미지로 변환한 다음 검출부의 밝기를 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 간이진단키트의 결과 해석

본 실험에 사용된 간이진단키트는 니트로셀룰로오스 막에 검출선과 표준선이 나타내는 일반적인 간이진단키트와는 달리 검출부 하나만을 이용하여 대상물질의 존재여부를 확인하였다. 또한 항체를 니트로셀룰로오스 막에 고정화하여 검출부를 제작하는 직접분석법을 이용하고 있으며 AFB1과 금나노입자와 AFB1-BSA 중합체의 분자량 차이로 발생하는 이동속도의 차이를 이용하여 니트로셀룰로오스 막에서 AFB1을 검출하게 된다.

간이진단키트의 성능평가는 검출부의 색변화를 기준으로 평가하였다. Fig. 1과 같이 검출부에 색이 나타나면 AFB1이 검출되지 않은 것으로 판단하고 검출부에 색이 나타나지 않으면 AFB1이 검출된 것으로 판단하였다.

### 표준 용액을 이용한 AFB1 검출

표지자로 사용되는 금나노입자와 AFB1-BSA 중합체의

**Table 1. Optimized fabrication conditions of the one-dot rapid detection kit for standard AFB1 solution.**

	Optimum condition Amount (μl)	
Gold nanoparticle: AFB1-BSA	100:1	2
AFB1-PAb	2.1 mg/ml	0.5

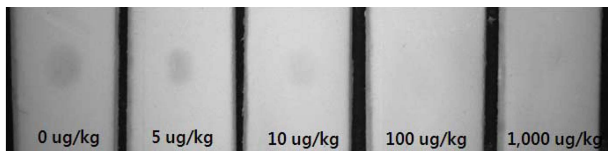
민감도 의해 간이진단키트의 성능이 크게 좌우된다. 금나노입자와 AFB1-BSA 중합체는 검출부의 AFB1-PAb와 결합하여 색 변화를 나타내게 되는데 이 색의 강도에 따라 간이진단키트의 검출한계가 결정된다. 간이진단키트의 민감도는 금나노입자와 AFB1-BSA 중합체의 결합비율과 분주량, 그리고 검출부에 사용되는 AFB1-PAb의 농도와 분주량이 간이진단키트의 민감도를 결정하는 주요 요인이다.

본 연구에서는 다양한 비율로 제작된 금나노입자와 AFB1-BSA 중합체와 AFB1-PAb를 제작하여 농도와 분주량에 따른 간이진단키트의 성능을 평가하였다. 그 결과 Table 1과 같은 조건에서 AFB1 검출용 간이진단키트는 최적 성능을 나타내었다.

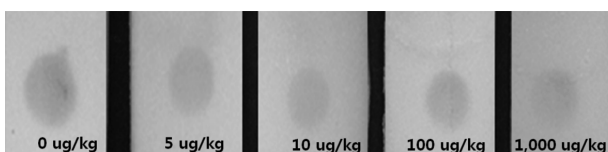
AFB1 표준용액의 농도는 0, 5, 10, 100, 1,000 μg/kg로 제작하였으며 간이진단키트 샘플패드에 AFB1 표준용액을 100 μl 씩 분주한 후 검출부의 색변화를 관찰하였다. 그 결과 Fig. 2와 같이 AFB1 표준용액의 농도가 0, 5, 10, 100, 1,000 μg/kg 로 증가할수록 검출부의 색의 강도가 약해지는 것으로 나타났다. 특히, AFB1 표준용액의 농도 5 μg/kg 이상에서는 색의 강도가 현저하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

**옥수수 추출물을 이용한 AFB1 검출**

AFB1 표준용액을 검출하기 위해 최적화된 간이진단키트를 이용하여 식품에 적용할 수 있는지를 검증하기 위해 옥수수 추출물을 이용하여 AFB1 검출 실험을 수행하였다. 옥수수 추출물을 이용한 실험은 AFB1을 0, 5, 10, 100, 1,000 μg/kg 총 5 종류의 농도로 제작하여 간이진단키트의



**Fig. 2. Detection results for standard AFB1 solutions of 0, 5, 10, 100, 1000 μg/kg.**



**Fig. 3. 1st detection results for extracted AFB1 solutions of 0, 5, 10, 100, 1000 μg/kg in corn.**

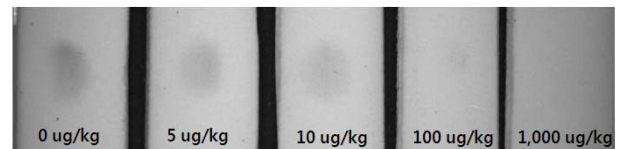
**Table 2. Fabrication conditions of the one-dot rapid detection kit for extracted AFB1 solution.**

	Optimum condition Amount (μl)	
Gold nanoparticle: AFB1-BSA	200:1	0.5
AFB1-PAb	2.1 mg/ml	0.5

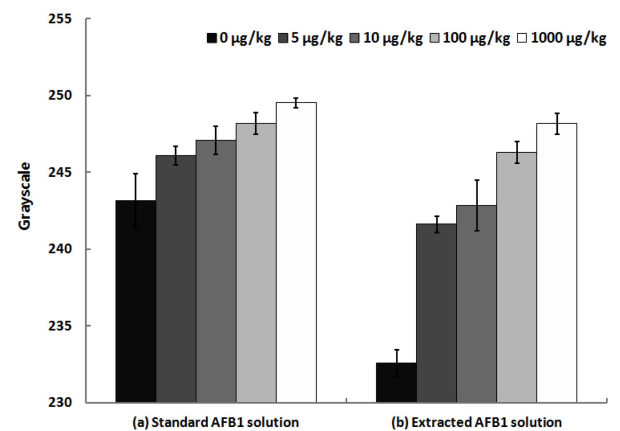
샘플패드에 100 μl 씩 분주한 후 검출부의 색변화를 관찰하였다.

실험결과 Fig. 3과 같이 AFB1의 농도가 증가하여도 검출부의 색의 강도는 감소하지 않고 일정하게 나타났다. 이것은 금나노입자와 AFB1-BSA와 AFB1-PAb이 강하게 결합하여 발색이 과도하게 나타난 것으로 판단된다. 따라서 금나노입자와 AFB1-BSA 중합체의 결합비율과 분주량 그리고 AFB1-PAb의 농도와 분주량을 조절하여 검출부에 나타나는 색의 강도를 조절하고 최적 제작조건을 재구명하였다. 조정된 간이진단키트 제작조건은 Table 2와 같이 금나노입자와 AFB1-BSA 중합체의 결합비율을 100:1에서 200:1로 변경하고 분주량은 2 μl에서 0.5 μl로 변경하였다. AFB1-PAb의 농도와 분주량은 이전의 결과와 동일하게 유지하였다. 그 결과 Fig. 4과 같이 시료의 농도가 0, 5, 10, 100, 1,000 μg/kg로 증가할수록 검출부의 색의 강도가 감소하는 것으로 나타났다.

AFB1 검출용 간이 진단키트의 객관적인 분석과 검출성능의 향상을 위해 이미지분석을 수행하였다. 이미지분석을



**Fig. 4. 2nd detection results for extracted AFB1 solutions of 0, 5, 10, 100, 1000 μg/kg in corn.**



**Fig. 5. Grayscale values for AFB1 concentration of 0, 5, 10, 100, 1000 μg/kg (a) Detection results using the standard AFB1 solution, (b) Detection results using the extracted AFB1 solution in corn.**

수행하여 Fig. 5와 같이 표준용액과 옥수수 시료를 이용한 실험결과를 나타내었다. 이 결과는 간이진단키트의 검출부 이미지를 측정된 다음 256 단계의 흑백이미지로 변환한 후 수치화한 결과이다. 그림에서 y축 값 256에 가까울수록 흰색을 나타내며 0에 가까울수록 진한 검은색을 나타낸다. 표준용액을 이용한 실험결과는 전체적으로 색의 강도가 약하게 나타났으며 AFB1의 농도가 0 µg/kg 일 때와 1,000 µg/kg일 때 색의 강도 차이가 약 6정도로 나타났다. 옥수수 시료에서 측정된 실험 결과는 표준용액을 이용한 실험결과에 비해 색의 강도차이가 큰 것으로 나타났으며 AFB1의 농도가 0 µg/kg 일 때와 1,000 µg/kg일 때 색의 강도 차이가 약 17정도로 나타났다. 이미지분석을 수행한 결과 옥수수 시료에서 AFB1의 검출한계는 5 µg/kg이었으며 검출한계를 기준으로 AFB1의 존재여부를 분명히 파악할 수 있었다. 그러나 색의 강도의 차이가 오차범위 내에서 구분이 어려우므로 정량적인 분석을 위해서는 향후 결과 값의 색의 강도 차이를 개선해야 할 것으로 판단된다.

이러한 실험결과는 기존의 간이진단키트를 이용한 AFB1 검출결과와 유사한 결과를 나타낸다(Xiluan et al., 2006; Shim et al., 2007; Anfossi et al., 2011). 최적화된 AFB1 간이진단키트의 검출한계는 5 µg/kg로 국내의 AFB1 식품규격기준인 10 µg/kg를 만족하고 있다. 이는 AFB1을 개별적으로 관리하는 EU의 영유아용 곡류가공품 및 이유식 (0.1 µg/kg)의 기준규격을 제외한 대부분 국가의 기준규격을 만족하는 결과이다. 그러나 본 실험은 one-dot 간이진단키트를 사용하므로 기준선에 사용되는 항체를 사용하지 않으므로 원가를 절감하고 2종 이상의 독소를 검출하는데 유리한 장점을 가지고 있다. 또한 기존의 간이진단키트는 검출부의 발색여부에 따라 검출대상의 존재유무를 판단하는 정성적인 분석에 주로 사용하였다. 그러나 본 실험의 이미지분석 결과에 따르면 색의 강도 차이를 개선한다면 정성적인 분석뿐만 아니라 정량적 분석 역시 가능할 것으로 나타났다.

#### 곰팡이독소 교차반응실험

최적화된 AFB1 검출용 간이진단키트를 이용하여 OTA의 교차반응성을 평가하였다. 교차반응성을 검증하기 위해 옥수수 추출물에 OTA의 농도를 0, 5, 10, 100, 1,000 µg/kg로 희석하여 시료를 제작하고 이 시료를 AFB1 간이진단키트에 주입하여 교차반응성을 평가하였다. 그 결과 Fig.

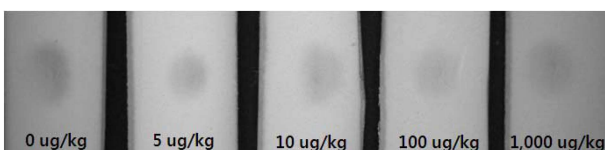


Fig. 6. Detection results for OTA concentration of 0, 5, 10, 100, 1000 µg/kg in corn.

6과 같이 OTA의 농도가 0에서 1,000 µg/kg 까지 증가하여도 시료에 AFB1이 존재하지 않는 경우와 마찬가지로 검출부에서 색이 진하게 나타났으며 AFB1의 농도에 따른 검출부의 색변화 역시 나타나지 않았다. 따라서 본 연구에서 제작된 AFB1 검출용 간이진단키트는 다른 곰팡이 독소와 교차하여 반응하지 않는 것을 확인할 수 있었다.

## 결론

본 연구는 곡류에서 빈번하게 발생하고 있는 AFB1을 간이진단키트를 이용하여 국내 식품 규격기준이상으로 검출하기 위하여 수행되었다. 간이진단키트는 새로운 간이진단키트 분석법인 one-dot 간이진단키트를 이용하였으며 결합패드의 금나노입자와 AFB1-BSA 중합체는 검출부의 AFB1-PAb와 결합하여 색 변화를 나타낸다. 이 때 검출부의 색의 강도에 따라 간이진단키트의 검출한계가 결정된다. 따라서 간이진단키트의 검출한계를 결정하는 중요한자인 금나노입자와 AFB1-BSA 중합체의 결합비율과 분주량 그리고 검출부에 사용되는 AFB1-PAb의 농도와 분주량을 조절하여 간이진단키트의 성능을 평가하고 최적 제작조건을 규명하였다. 이 연구결과를 요약하면 다음과 같다.

첫째, AFB1 표준용액 검출을 위해 금나노입자와 AFB1-BSA 중합체의 결합비율은 100:1, 분주량은 2 µl, AFB1-PAb의 농도는 2.1 mg/ml, 분주량은 0.5 µl인 조건에서 간이진단키트를 제작하였다. 그 결과 표준용액을 이용한 AFB1 검출 한계는 5 µg/kg로 나타났다.

둘째, 옥수수 추출물 내에 존재하는 AFB1을 검출하기 위해 금나노입자와 AFB1-BSA 중합체의 결합비율은 200:1, 분주량은 0.5 µl, 그리고 AFB1-PAb의 농도는 2.1 mg/ml, 분주량은 0.5 µl인 조건으로 간이진단키트를 제작하였다. 그 결과 옥수수 추출물에 희석된 AFB1의 검출한계 역시 5 µg/kg로 나타났다.

셋째, 본 연구결과는 국내뿐만 아니라 일본과 EU 등의 국제적인 AFB1 기준인 10 µg/kg을 만족하고 있다.

## 감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 어젠다사업(과제번호: PJ008440)의 지원에 의해 이루어진 것임.

## 참고문헌

- Ammida NHS, Micheli L, Pallechi G. 2004. Electrochemical immunosensor for determination of aflatoxin B<sub>1</sub> in barley. *Anal. Chim. Acta* 520: 159-164.
- Anfossi L, D'Arco G, Calderara M, Baggiani C, Giovannoli C, Giraudi G. 2011. Development of a quantitative lateral flow immunoassay for the detection of aflatoxins in maize. *Food*

- Addit. Contam. 28: 226-234.
- Babacan S, Pivarnik P, Letcher S, Rand A. 2002. Piezoelectric flow injection analysis biosensor for the detection of *Salmonella* Typhimurium. J. Food Sci. 67: 314-320.
- Bazin I, Nabais E, Lopez-Ferber M. 2010. Rapid visual tests: Fast and reliable detection of ochratoxin A. Toxins 2: 2230-2241.
- Bennett JW. 1987. Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology and mycopathology. Mycopathologia 100: 3-5.
- Bhatnagar D, Yu J, Ehrlich KC. 2002. Toxins of filamentous fungi. Chem. Immunol. 81: 167-206.
- Blesa J, Sorianoa JM, Moltó JC, Marín R, Mañesa J. 2003. Determination of aflatoxins in peanuts by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography. J. Chromatogr. A. 1011: 49-54.
- Campbell TC, Hayes JR. 1976. The role of aflatoxin metabolism in its toxic lesion. Toxicol. Appl. Pharmacol. 35: 199-222.
- Choi SM, Kim KY, Om AS, Moon JH, Lee SD, Kim HJ. 2012. The selection of basic platform for improving the sensitivity of neutravidin rapid detection kit. CNU J. Agric. Sci. 39: 613-618.
- Hong SY. 2011. Development of a semi-quantitative lateral flow immunoassay for the analysis of human cartilage oligomeric matrix protein. Ajou university.
- Hussein HS, Brasel JM. 2001. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. Toxicology 167: 101-134.
- Jang MR, Lee CH, Cho SH, Park JS, Kwon EY, Lee EJ, Kim SH, Kim DB. 2007. A survey of total aflatoxins in food using high performance liquid chromatography-fluorescence detector (HPLC-FLD) and liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Korean J. Food Sci. Technol. 39: 488-493.
- Kim GY, Yang GM, Park SB, Kim YH, Lee KJ, Son JY, Kim HJ, Lee SR. 2011. Rapid detection kit for *Salmonella* Typhimurium. J. Biosystems Eng. 36: 140-146.
- Moon JH, Kim GY, Lee SD, Park SB, Kim HJ. 2012a. Optimization of lateral flow assay for the dual-detection of mycotoxins. Food Eng. Prog. 16: 214-218.
- Moon JH, Kim GY, Lee SD. 2012b. A gold nanoparticle and AFB<sub>1</sub>-BSA Conjugates based lateral flow assay method for the analysis of AFB<sub>1</sub>. Materials 5: 634-643.
- Park JW. 2006. Analysis of peanut and peanut butter retailed in Korea for aflatoxin B<sub>1</sub>. J. Food Sci. Technol. 38: 309-312.
- Schuh M. 1997. Clinical and subclinical events related to the presence of mycotoxins in cattle feed. J. Vet. Med. A. 52: 93-97.
- Shim WB, Yang ZY, Kim JS, Kim JY, Kang SJ, Woo GJ, Chung YC, Eremin SA, Chung DH. 2007. Development of immunochromatography strip-test using nanocolloidal gold-antibody probe for the rapid detection of aflatoxin B<sub>1</sub> in grain and feed samples. J. Microbiol. Biotechnol. 17: 1629-1637.
- Xiluan S, Xiaolian Z, Jian T, Xiaohong, Jun Z, Chu FS. 2006. Development of an immunochromatographic assay for detection of aflatoxin B<sub>1</sub> in foods. Food Control 17: 256-262.