J. Fd Hyg. Safety 10(1), 1-6(1995)

*Aspergillus versicolor*가 생산하는 sterigmatocystin에 대한 항체생산

윤원한 · 하우송 · 강진순* · 여명재** · 전향숙 · 정덕화**

경상대학교 의과대학, *진주전문대학 가정학과

**경상대학교 식품공학과, ***한국식품개발연구원

The Production of Antibody Against Sterigmatocystin Produced by *Aspergillus versicolor*

Won-Han Youn, Woo-Song Ha, Jin-Soon Kang*, Myeang-Jae Yeo, Hyang-Sook Chun*** and Duck-Hwa Chung****

College of Medicine, Gyeongsang National University

**Department of Home Economics, Jinju Junior College*

***Department of Food Science & Technology, Gyeongsang National University*

****Korea Food Research Institute*

ABSTRACT — In order to establish the enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) of sterigmatocystin produced by *Aspergillus versicolor*, we experimented and obtained following results. Two of three rabbits which had been immunized with sterigmatocystin-hemiacetal-BSA produced antibodies against sterigmatocystin at 15 weeks. The produced antibodies were specific for sterigmatocystin and sterigmatocystin-hemiacetal but didn't cross react with other sterigmatocystin analogues in a significant degree. DMF : 4% KCl (18 : 2) mixed solution was most effective to dissolve sterigmatocystin. For the preparation of sample solution to determine sterigmatocystin by ELISA, sample was extracted with $CHCl_3$ and dried, then the dried sample was redissolved with 100 μl DMF+4% KCl mixture. 10~1,000 ng/ml level of standard sterigmatocystin could be applied to the established ELISA. When artifically contaminated rice were assayed by the ELISA, the average recovery of sterigmatocystin spiked to 25~500 ng/g was 109% (97~116%), and mean interwell coefficient of variation was 21% (11~28%).

Key words □ *Aspergillus versicolor*, sterigmatocystin, ELISA, analogues

Sterigmatocystin은 *Aspergillus versicolor, Aspergillus nidulans, Aspergillus rugulosum* 및 *Bipolaris* sp. 등의 곰팡이가 생성하는 독성대사산물로서 이들 곰팡이의 토양을 비롯한 환경에의 광범위한 오염을 최근들어 수많은 농산물에서 발견되고 있다.[1-5] 이러한 sterigmatocystin은 aflatoxin B_1 생합성의 전구체로서 포유동물에 독성이 있을 뿐만 아니라 강력한 발암물질로 알려져 있으나,[6] aflatoxin B_1의 연구에 밀려 연구의 활성화가 되지 못하다가 1971년 이후부터 식품과 사료에서의 대규모 오염 확인으로 인간은 물론 동물의 건강에 중애한 장해를 일으킬 수 있는 mycotoxin으로 인식되고 있다.[7-10]

일찌기 Birkinshow에 의해 *Aspergillus versicolor*의 대사산물로 인정된 sterigmatocystin은 생성균의 분리, 생성조건 검토 등 주로 기초연구가 이루어졌으며 25 ppb의 저농도의 sterigmatocystin의 확인이 가능하게 되었다.[15-19] 그러나 종래의 방법은 추출과 정제과정에 많은 시간과 유기 용매가 소비되고 넓은 공간, 많은 기구 그리고 전문 인력을 필요로 할 뿐만 아니라 발암 물질인 sterigmatocystin을 취급하는 과정에서 발생할 수 있는 안전성 문제가 제기되었다.[20-22] 그 이후 효소 화학적 방법의 도입으로 Pestka 등[23]이 ra-

dioimmunoassay(RIA)법에 의한 aflatoxin B_1 분석법을 고안하였으나, 방사선 물질의 안전성, 폐기물 등의 문제점이 발생되었다. 그 후 다시 Pestka 등[24]에 의해 개발된 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)에 의한 aflatoxin의 분석법은 많은 시료를 동시에, 그리고 안전하게 분석할 수 있는 효과적인 방법으로 평가되었다. Yaguan,[25] Morgan[26] 등도 sterigmatocystin 단백질 항원을 합성하고, 이에 대한 항체를 생산한 후 ELISA법을 이용하여 실제 식품속의 sterigmatocystin함량을 위한 ELISA조건을 검토한 바 있으나 sterigmatocystin가 일반 mycotoxin[27]과 달리 methanol 등의 유기용매에 잘 녹지 않고 실험조건이 까다로와 실제 응용을 위해서는 많은 문제점이 있는 것으로 지적하고 있다.

그러나 국내에서는 mycotoxin에 대한 연구는 대단히 미흡한 실정이며[28-30] 특히 sterigmatocystin에 대한 항체 생산에 관한 연구는 발표된 바가 없다. 따라서 본 연구는 *Aspergillus versicolor*가 생산하는 sterigmatocystin에 대한 항체생산을 위해 먼저 sterigmatocystin에 대한 sterigmatocystin-hemiacetal-BSA conjugate를 합성하고, 이를 항원으로 토끼를 실험동물로 항체를 생산한 다음 ELISA조건을 확립하여 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 표준 sterigmatocystin, *o*-methylsterigmatocystin, aflatoxin B_1, aflatoxin M_1, Tween-20, bovine serum albumin(BSA), 2-2′-azino-di-3-ethyl-benzenthiazoline sulfonic acid(ABTS)와 horseradish peroxidase(HRP) 등은 Sigma Chemical Co. (ST. LOUIS, Mo)에서 구입하였고, complete & incomplete Freund's adjuvant는 Difco Laboratories(Detroit, MI)에서 구입하였으며, 항체 생산을 위한 실험동물은 New Zealand산 흰 토끼를 사용하였다. 그 외 시약들은 특급 이상을 사용하였다.

Sterigmatocystin 단백질 결합체 생산

Pohland 등[31]의 방법에 따라 10 mg의 sterigmatocystin을 10 ml의 acetone에 용해시켜 10% H_2SO_4를 50 μl 가하여 62℃ 에서 3시간 동안 반응시켰다. 반응 후 감압, 농축하고 10 ml의 물을 가한 다음, 5 ml의 $CHCl_3$로 몇 차례 sterigmatocystin-hemiacetal을 추출하고, 추출액을 Sep Pak silicagel cartridge를 통과시켜 흡착시켰다. 다시 10 ml의 $CHCl_3$로 세척하여 유리상태의 sterigmatocystin을 제거하고, 흡착된 sterigmatocystin-hemiacetal은 10 ml의 acetone : chloroform(50 : 50) 혼합액으로 탈착시켜, TCL로 확인 후 건조시켜 −20℃ 에 보관하였다.

또한 sterigmatocystin-hemiacetal과 단백질의 결합체는 Gaur 등[15]의 방법에 준하였다. 즉, 2 mg의 sterigmatocystin-hemiacetal을 0.05 M phosphate(pH 7.4) 5 ml에 넣고, 20 mg BSA와 37℃ 에서 magnetic stirrer로 교반하면서 30분간 반응시켰다. 반응액을 4℃ 증류수에 옮겨 0.013 M $NaBH_4$ 0.1 ml을 첨가하여 다시 30분간 반응시켰다. 여기에 0.1 N HCl 0.2 ml을 첨가하여 반응을 중지시키고, 증류수에서 48시간 투석하여 냉동 건조한 후 −20℃ 에 보관하면서 실험에 사용하였다.

항체 생산과 정제

Sterigmatocystin에 대한 항체 생산은 Chu 등[33]의 방법으로 행하였다. 즉, 600 μg의 sterigmatocystin-hemiacetal-BSA를 1 ml의 complete Freund's adjuvant와 혼합하여 유화 시킨 후 2 ml를 취해 New zealand산 흰토끼의 뒷부분에 20~40번 정도로 나누어 면역시키고, 4주 후에는 booster 접종을 하였다. 1차 면역 후 부터 1주 간격으로 채혈하여 면역글로불린을 분리하였다.

채취한 혈액은 4℃ 에서 1시간 저장 후 원심 분리하여 상층액을 얻은 다음 Garvey 등[32]의 방법에 따라 유안 침전법으로 혈청(serum)을 정제하였다. 즉, 상층액 반 정도의 포화 유안용액을 magnetic stirrer으로 교반하면서 한 방울씩 떨어뜨리며 혈청을 침전시켜 원심분리하는 조작을 3번이상 반복하였다. 수거한 혈청을 처음 양의 PBS로 녹이고 3일간 4℃ 에서 투석시킨 후, 원심분리하여 침전물을 버리고 항체 역가를 측정한 다음, 역가가 높은 것은 1 ml씩 나누어 냉동, 건조시켜 −20℃ 에 보관하면서 필요에 따라 실험에 사용하였다. 이때 항체의 역가측정은 Pestka 등[24]의 방법에 준하였다. 즉 Sterigmatocystin-hemiacetal-BSA으로 coating된 microtiter plates에 50 ul의 희석된 항체(serial dilution)를 가하고 1시간 동안 반응시켰다. 3번 세척한 후 50 μl의 anti-rabbit IgG-HRP를 가하고 37℃ 에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 7번 세척한 후, 기질인 ABTS를 가한 다음 반응정지액(0.1% sodium azide in 0.3 M citric acid) 100

μl를 가하여 발색반응을 중지시키고 흡광도를 측정하였다.

항체의 특이성 측정

Pestka 등[24]이 제안한 direct competitive ELISA로 항체의 특이성 및 ELISA조건을 조사하였다. microplate에 항체를 coating한 다음 40℃에서 하루밤 건조시키고, coating한 plate를 사용전 3번 세척한 후 0.1% BSA를 첨가하고 37℃에서 30분간 반응시킨 후 0.1 M PBS-Tween 20으로 3번 세척하였다. 여기에 sterigmatocystin과 이성체(analogues)들을 각각 다른 농도로 sterigmatocystin-hemiacetal-HRP(1 : 50)와 주입한 후 1시간 동안 37℃에서 반응시켰다. Plate는 다시 세척하고 결합된 sterigmatocystin-hemiacetal-HRP를 일정기간 발색시킨 후, 반응정지액으로 발색반응를 정지시키고 ELISA reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하여 미리 작성된 표준 곡선(standard curve)으로 함량을 계산하였다.

결과 및 고찰

항체의 생산과 반응조건

Sterigmatocystin는 분자량이 324 정도의 저분자 화합물로서 항원성이 결핍되어 있기 때문에 sterigmatocystin에 대한 항체생산을 위해 실험방법에서와 같이 sterigmatocystin를 sterigmatocystin-hemiacetal로 바꾸어 coupling site를 부여시키고 여기에 단백질(bovine serium albumin)을 결합시켜 항원성을 갖게한 다음 이를 항원으로 면역시킨 토끼에서 얻은 혈청의 역가를 측정하였다. 그 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 토끼 A에서 얻은 혈청이 sterigmatocystin에 대해 가장 높은 양성반응을 보였고, 토끼 B에서 얻은 혈청에서도 750배까지 약간의 양성반응을 보였다. 그러나 토끼 C에서 얻은 혈청은 전혀 반응을 나타내지 않았다.

아울러 항체의 반응조건을 개선하기 위해 몇가지 실험을 행하였다. Sterigmatocystin는 앞서 Yaguan 등[25]이 지적했듯이 일반유기용매에 난용성으로 실제 sterigmatocystin를 용해하는데는 어려움이 있다. 따라서 이를 위해 사용한 각종 유기용매 즉 acetone, acetonitrile, acetonitrile+KCl, DMF, DMF+KCl 등의 용액이 효소면역반응이 어떤 영향을 미치는가를 조사하였다. Table 1에서 보는 바와 같이 사용한 유기용매 중 acetone, DMF+KCl 혼합액이 다른 용액에

Table 1. Comparison of various solvents to dissolve sterigmatocystin on enzyme-linked immunosorbent assay

ST(ng/ml)	Percent maximal absorbance				
Solventt	0	10	100	500	1000
Actone	100	90	78	48	30
Acrtonitrile	95	91	83	59	36
Acrtonitrile-KCl(18+2)	93	89	76	52	31
DMF	100	91	84	60	34
DMF-KCl(18+2)	98	91	74	39	25

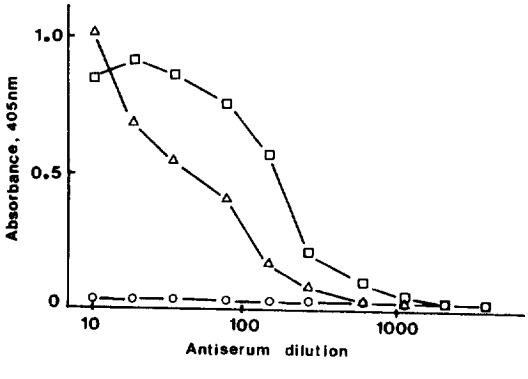

Fig. 1. Titers of antiserum against sterigmatocystin.
□−□: A rabbit, △−△: B rabbit, ○−○: C rabbit.

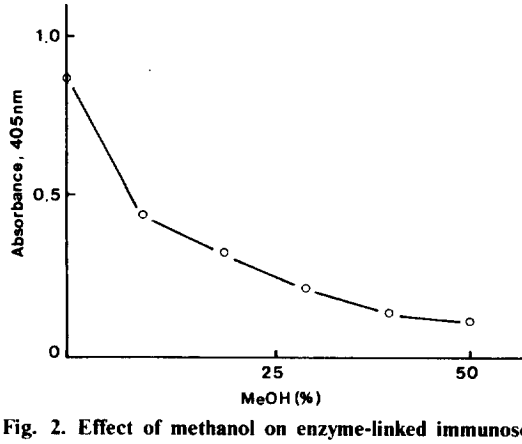

Fig. 2. Effect of methanol on enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of sterigmatocystin.

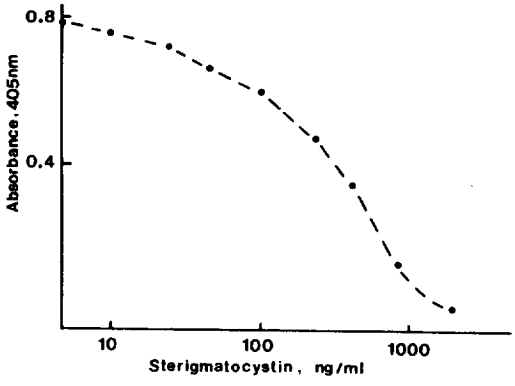

Fig. 3. Standard curve of sterigmatocystin.

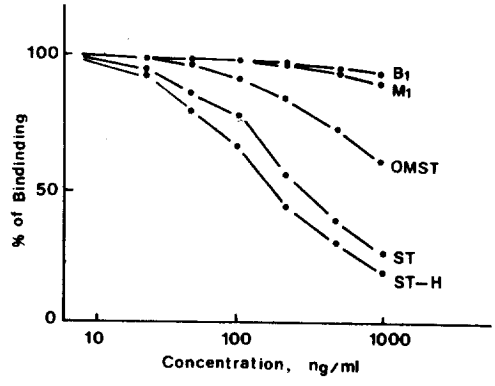

Fig. 4. Cross reaction with sterigmatocystin and its analoques.
B_1: Aflatoxin B_1, M_1: Aflatoxin M_1, OMST: *o*-methylsterigmatocystin, ST: Sterigmatocystin, ST-H: Sterigmatocystin-hemiacetal.

비해 효소면역반응에 효과적인 것으로 나타나 sterigmatocystin 용해를 본 실험에서는 DMF+KCl 혼합액을 사용하였다.

한편 시료 중의 sterigmatocystin의 효과적인 추출방법을 모색하기 위해 일반적으로 mycotoxin 추출에 많이 사용되는 methanol이 생산된 항체의 효소면역반응에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 Fig. 2에서와 같이 다른 mycotoxin, 즉, aflatoxin B_1, zearalenone, T-2 toxin, vomitoxin 등은 시료의 methanol-water(70 :73) 추출물을 효소면역반응에 직접 시료로 사용하는 것이 가능하였으나 본 실험에서는 강력한 저해반응이 나타났다.

따라서 methanol의 경우 고농도에서 시료의 추출은 가능해도 효소면역반응에 적용키 어려우므로 이후 본 실험에서의 시료추출을 위해서는 먼저 시료로 $CHCl_3$로 추출, 건조시키고, 이것을 DMF+KCl(18 : 2) 용액에 용해시켜 효소면역측정용 시료로 사용하였다.

이러한 항체반응 조건으로 표준 sterigmatocystin을 사용하여 효소면역측정법에 의한 표준곡선을 작성하였다. 그 결과는 Fig. 3와 같으며 표준곡선에서의 반응범위는 10～1,000 mg/*l*이었다.

이는 T-2 toxin,[31] zearalenone,[4] aflatoxin B_1[24]과는 다소 높아 앞으로 sterigmatocystin의 특성을 고려하여 보다 효과적인 분석법을 고안해야 할 것으로 생각하는 바이다.

항체의 특이성

항체의 반응조건을 조사하기 위해 먼저 특이성을 살펴보았다. 이때 사용한 이성체들은 sterigmatocystin, sterigmatocystin-hemiacetal, *o*-methylsterigmatocystin, aflatoxin B_1, 그리고 aflatoxin M_1이었다. Polyclonal 항체의 교차반응은 ELISA에서 항체의 결합을 50% 억제하는데 필요한 sterigmatocystin 이성체들의 상대적 농도(ng/m*l*)로서 결정되는데, sterigmatocystin-hemiacetal과 sterigmatocystin은 선택적으로 특이성을 보였지만 aflatoxin B_1 그리고 aflatoxin M_1과는 거의 반응을 보이지 않았다.

Table 2. Recovery of sterigmatocystin spiked rice by ELISA

ST added (ng/g)	Recovery		Recovery ratio (%)
	Mean(ng/g)± SD	CV%	
0	–	–	–
25	29± 6	21	116
50	56± 14	25	112
100	108± 24	28	108
250	285± 32	11	114
500	487± 71	15	97

회수율측정

생산된 항체를 활용하여 실제 시료에 오염된 sterigmatocystin를 효소면역법으로 측정하기 위해, 회수율 검정을 실시하였다. 즉, 100, 250, 500 mg/g의 농도로 sterigmatocystin를 쌀에 오염시킨 후 건조하고, 이를 15 m*l* $CHCl_3$로 추출하였다. 추출액은 여과 후 질소

가스로 건조시키고, 다시 100 μl의 DMF+4% KCl(18 : 2) 혼합액으로 녹여 그 중 10 μl를 취해 적당히 희석 후 실험에 사용하였다. 그 결과 Table 2에서와 같이 sterigmatocystin 500 mg/g의 경우는 97%의 회수율을 보였으나 그외 구간에서는 100% 이상의 높은 값을 나타내었다.

이러한 결과로 미루어 볼 때 효소면역측정법에 의해 실제 농산물을 포함한 시료내에서의 sterigmatocystin 검색을 위해 효소면역반응에 영향을 끼치지 않는 보다 용이한 추출법의 개발과 발암성이 강한 sterigmatocystin에 대한 안정성 등을 고려한 지속적인 연구가 이루어져야 될 것으로 생각하는 바이다.

감사의 말씀

본 연구는 한국학술진흥재단의 '93 학술연구조성비 지원에 의해 수행되었습니다. 연구비지원에 감사드립니다.

국문요약

*Aspergillus versicolor*가 sterigmatocystin에 대한 효소면역측정법을 개발하기 위하여 실험한 결과는 다음과 같다. 즉, sterigmatocystin-hemiacetal-BSA를 면역시킨 토끼 3마리 중 2마리에서 15주째 높은 역가를 보인 항체를 생산하였다. 생산된 항체는 sterigmatocystin, sterigmatocystin-hemiacetal과는 특이성 있게 반응하였으나 *o*-methylsterigmatocystin 등의 다른 이성체들과는 큰 교차반응을 보이지 않았다. 표준 sterigmatocystin를 녹이는데 적당한 유기용매는 DMF+4% KCl(18 : 2) 혼합액이었고, 시료용액 자체는 실험재료를 $CHCl_3$로 추출 후 건조하고 DMF+4% KCl 혼합액에 녹여 효소측정용액 시료로 사용하였다. 효소면역측정법으로 sterigmatocystin를 분석할 경우 표준곡선의 반응범위는 10~1,000 ng/ml이었고, sterigmatocystin에 대한 회수율은 500 ng sterigmatocystin로 쌀에 spike한 경우 97%로 나타났고, 그외 구간은 대체로 100% 이상의 높은 값을 보였다. 이러한 결과를 토대로 효소면역반응에 영향을 주지않는 보다 용이한 sterigmatocystin의 추출법의 개발과 발암성이 강한 sterigmatocystin에 대한 안정성 등에 대한 지속적인 연구가 계속되어져야 할 것이다.

참고문헌

1. Shannon, G.M. and Sotwell, O.L.: Thin layer chromatographic determination of sterigmatocystin in cereal gransis and soybeans. *J. Assoc. Aff. Anal. Chem.*, **59**, 963-965 (1976).
2. Gaut, P.K., Lau, H., Pestka, J.J. and Chu, F.S.: Production and characterization of aflatoxin B_2 any serum. *Appl. Environ, Microbiol.*, **50**, 332-336 (1985).
3. Liu, M.T., Gart, B.P. and Pestka, J.J.: Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the mocotoxin zearalenone. *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 332-336 (1985).
4. Warner, R., Ram, B.P., Hart, L.P. and Pestka, J.J.: Screening for zearalenone in corn by competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay. *L. Agric. Food. Chem.*, **34**, 714-717 (1989).
5. Rabie, G., Lubben, J.A. and Steyen, M.: Production of sterigmatocystin hemiacetal produced by *Aspergillus versicolor* and *Bipolaris sorokiniana* in semisynthetic liquid and solid media. *Appl. Environ. Microbiol.*, **32**, 206-208 (1976).
6. Holzapfel, C.W., Purchase, I.F.H., Steyn, P.S. and Gouws, L.: The toxicity and chemical assay of sterigmatocystin, carcinogenic mycotoxin, and its isolation from two new fungal sources. *s. Afr. Med. L.*, **40**, 1100-1101 (1966).
7. Hsiehm, D.P., Lin, M.T. and Yao, R.C.: Conversion of sterigmatocystin to aflatoxin B_1 by *aspergillus paraciticus. Biochem. Bio. Res. Commun.* **52**, 992-997 (1973).
8. Cole, R.J. and Kirksey, J.W.: Dihydro-*o*-methyl sterigmatocystin, a new metabolite from *Aspergillus flavus.*

Tetrahedrom Lett., **35**, 3109-3122 (1970).

9. Davies, J.E., Kirkaldy, K. and Roberts, J.C.: Studies on mycological chemistry. VII. Sterigmatocystin, a metabolite of *Aspergillus versicolor*(Vuillemin) Tiravoschi. *J. Chem. Soc.*, pp. 2169-2178 (1960).
10. Singh, R. and Hsieh, D.P.H.: Enzymatic conversion sterigmatocystin into Aflatoxin B_1 by cell-free extracts of *Aspergillus paraciticus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **31**, 743-745 (1976).
11. Athnsios, A.K. and Kuhn, G.: Improved thin layer chromatographic method for the isolation and estimation of sterigmatocystin in grains. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **60**, 104-106 (1972).
12. Birkinshaw, J.H. and hammady, I.M.: Metabolic products of *Aspergillus versicolor* (Vuillemin) Titraboschi. *Biochem. J.* **65**, 162-166 (1957).
13. Schroeder, H.W. and Kelton, W.H.: Production of sterigmatocystin by some species of the genus *Aspergillus* and its toxicity to chicken embryos. *Appl. Environ. Microbiol.* **30**, 589-591 (1975).
14. Scott, M., Van Walbeek, B. and Anyeti, D.: Mycotoxin (ochratoxin A, citrinin and sterigmaticystin) and toxigenic fungi in grains and other agricultural products. *J. agric. Food. Chem.*, **20**, 1103-1109 (1972).
15. Gaur, P.K., Lau, H., Pestka, J.J. and Chu, F.S.: Production and chracterization of aflatoxin B_1 antiserum. *Appl. Environ. Microbial.* **41**, 478-482 (1981).
16. Stack, M.E., Nesgeim, S., Brown, N.L. and Pohland, A.E.: Determination of sterigmatocystin in corn oats by gel permeation and high-pressure liquid chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **59**, 966-970 (1976).
17. Steyn, M. and Rabie, C.J.: Production of sterigmatocystin. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **58**, 622-623 (1975).
18. Uorster, R. and Puerchase, I.F.H.: A method for the determination of sterigmatocystin in grain and oil seeds. *Analyst.*, **93**, 994-996 (1968).
19. Schmidt, R., Monadani, J., Ziegengangen, E. and Dose, K.: High-performance liquid chromatography of the mycotoxin sterigmatocystin and its application to the analysis of moudly rice for sterigmatocystin. *J. Chromatog.* **207**, 435-438 (1981).
20. Chang, H.I., Devries, J.W. and Hobbes, W.E.: Comparative study of two methods for extraction of aflatoxin from peanut meal and peanut butter. J. Assoc. Offic. Anal. Chem., **62**, 1281-1284 (1979).
21. Eppley, R.M., Stoloff, L., Trucksess, M.W. and Chung, D.W.: Survay of corn for *Fusarium* toxin. *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*, **57**, 632-635 (1974).
22. Holaday, C.E., and Lansden, J.A.: Rapid screening method for aflatoxin in a number of product. *J. Agr. Food. Chem.*, **23**, 1134-1136 (1975).
23. Pestka, J.J., Lee, Y.K., Harder, W.O. and Chu, F.S.: Comparision of a radioimmunoassay and an enzyme-linked immunosorbent assay for the analysis of aflatoxin M_1 in milk. *J. Assoc. Offic. Chem.*, **64**, 294-301 (1981).
24. Pestka, J.J., Gaur, P.K. and Chu, F.S.: Quantitation of aflatoxin B_1 by an enzyme-linked immunosorbent microassay. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**, 1027-1031 (1980).
25. Yaguan Li and Chu, F.S.: Production and characterization of antibody against sterigmatocystin. *J. of Food safety.*, **6**, 119-127 (1984).
26. Morgan, R.M., Angray, S., Herney, K. and Chan, W.S.: Production of antisera against sterigmatocystin hemiacetal and its potential enzyme-linked immunosorbent assay for sterigmatocystin in barley. *J. Sci. Food. Agric.*, **37**, 873-880 (1986).
27. Pestka, J.J., Lee, S.S., Lau, H.P. and Chu, F.S.: Enzyme-linked immunosorbent assay for T-2 toxin. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **58**, 940-944 (1981).
28. Lee, T. Mycotoxins produced by toxigenic *Fusarium* species isolated from corn. M.S., Thesis, Seoul National University, Suwon, Korea. pp. 84(1991).
29. 이인원, 김국형, 정후섭: 우리나라 옥수수 산지로부터 분리한 Fusarium균의 독성. 한국식물병리학회지, **4**(1), 40-48 (1988).
30. 구성회, 이용욱, 정덕화, 김종규: 한약재가 *Aspergills parasiticus* R-716의 생육과 aflatoxin 생성에 미치는 영향. 한국식품위생학회지, **3**(2), 89-91 (1988).
31. Pohaland, A.E., Cushumac, N.E. and Andrellose, P.J.: Aflatoxin B_1 hemiacetal. *J. Assoc. Chem.*, **51**, 907-910 (1968).
32. Garavey, J.S., Cremer, N.E. and Sussdorf, D.: Ammonium sulfate precipitation. *In* D.H. Cambell(ed) Methods in immunology, 3rd. The Benjamin/Cummings pubilshing Co., New York, pp. 219-219 (1977).
33. Chu, F.S. and Ueno, I.: Production of antiboy against aflatoxin B_1. *Appl. Environ. Microbial.*, **33**, 1125-1128 (1977).