Kor. J. Food Hygiene 7(1), 15-22 (1992)

Grapefruit종자추출물을 이용한 *Aspergillus parasiticus*의 생육 및 Aflatoxin생성억제 효과

조성환 · 정덕화 · 서일원* · 이현숙** · 황보혜** · 박우포***

경상대학교 식품공학과, *(주) 아비콘 케미

**경상대학교 미생물학과, ***마산전문대학식품영양학과

Inhibitory Effects of Grapefruit Seed Extract on Growth and Aflatoxin Production of *Aspergullus parasiticus*

Sung-Hwan Cho, Duck-Hwa Chung, Il-Won Seo*, Hyun-Sook Lee, Bo-Hye Hwang** and Woo-Po Park*****

Department of Food Science and Technolgy, Gyeongsang National University, Chinju, 660-701

**ABCON CHEMIT Co., Ltd., Seoul, 150-010*

***Department of Microbiology, Gyeongsang National University, Chinju, 660-701*

****Department of Food and Nutrition, Masan Junior College, Masan 634-850*

ABSTRACT－This study was conducted to determine the potential of grapefruit seed extract to support *Aspergillus parasilicus* growth and aflatoxin production. The grapefruit seed extract inhibited the growth and aflatoxin production of the fungi in the level of more than 4,000 ppm and 3,000 ppm in the medium, respectively. Grapefruit seed extract appears to block the conversion of acetate, averufin and versiconal acetate into aflatoxin *in vitro* experiments. The addition of grapefruit seed extract to the feeding experiment systems did not inhibit the incorporation of ^{14}C-labeled versicolorin A, versicolorin A hemiacetal and sterigmatocystin into aflatoxin. In the electron microscopic examination the biocidal action of grapefruit seed extract was related to the disturbance of cell menbrane funtion, inhibiting cellular respiration.

Keywords□Grapefruit seed extract, *Aspergillus parasiticus*, Aflatoxin, Biocidal action

식량이나 사료로 이용되는 곡류 및 곡류가공제품에 곰팡이가 오염되면 변질에 따른 경제적 손실을 가져오는 동시에, 독소성분이 생성되어 국민보건 및 가축위생상의 문제가 될 수 있다. 식품원료나 가공식품중에 기생하는 각종 미생물이 생성하는 독성대사산물은 일반적으로 식중독 분야에서 문제시되어 왔는데, 이는 주로 곡류 중에 독성물질을 생성하는 곰팡이가 변식해서 피해를 주는 것으로 과거에는 자연독에 의한 식중독의 영역에서 분류하였으나, 최근에는 이를 mycotoxin 단독의 분야로 하여 연구가 진행되어야 할 필요성이 크게 실감되고 있는 실정이다. Aflatoxin과 같은 mycotoxin은 식품섭취와 관련하여 국민보건상의 위해가능성을 내포하고 있는 유독성분이므로 곰팡이를 활용한 대두발효 식품과 곡류를 식품 또는 가축사료로 많이 이용하고 있는 한국인의 경우, mycotoxin에 노출될 위험성이 상존하고 있으며 국내 주요도시의 가정에서 수집한 메주에서 7.4%, 된장에서 8.8%의 빈도로 aflatoxin이 검출되었고, 부산에서 수집한 된장시료중의 하나는 84 ppb의 함량을 보여 FAO/WHO의 허용량 30 ppb의 3배에 가까운 높은 수치를 나타낸 연구결과[1)]

Received for publication 13 April, 1992
Reprint request: Dr. S.H. Cho at the above address

는 묵과하지 못할 좋은 예에 해당한다고 볼 수 있다.

1970년대 후반에는 동남아에서 수입된 가축사료용 땅콩깻묵 중에 200~300 ppb의 aflatoxin이 오염된 것으로 알려져 농수산부에서는 가축사료에 대한 잠정기준으로 aflatoxin의 허용량을 100 ppb로 설정하기도 하였으며, 1981년에는 일본으로 수출한 땅콩가공식품에서 aflatoxin이 검출되어 반품된 사건이 발생되기도 하였다. 최근 정 등[2]은 영남지방에서 생산되는 농작물인 쌀, 옥수수, 보리, 땅콩, 대두, 겉보리와 가정에서 수거한 메주시료로부터 전체시료의 1.3%가 aflatoxin생성균에 오염되어 있음을 확인하고 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)법을 이용하여 aflatoxin을 분석한 결과, 쌀의 경우 전체시료의 4.6%가, 보리의 경우 3.4%가 aflatoxin B_1에 오염되어 있다고 발표하였다. 아울러, 이 실험결과에서 쌀시료에서는 3.3~7.5 ppb, 보리시료에서는 3.6~9.6 ppb의 aflatoxin B_1이 함유되어 있는 것으로 나타나 곡물생산 및 저장 중 aflatoxin에 오염되어 있을 가능성을 저적해 주고 있다.

농산물 및 그 가공식품에 aflatoxin 등의 mycotoxin이 오염되는 것을 방지하는 방법은 우선적으로 mycotoxin fungi의 생육을 억제하는 일이며 이것은 환경의 조절, 항곰팡이제의 사용 및 자연적 저항인자를 함유하고 있는 물질의 이용으로 가능하며, 현재까지 보고된 연구발표들이 그 진행과정을 설명해 주고 있다. 그러나 이와같은 연구들은 대부분 aflatoxin 생성균주의 배양액 중에 여러가지 항곰팡이성 물질을 첨가하여 곰팡이의 생육 및 aflatoxin 생합성 저해효과를 결과로 유도했을 뿐, 생합성억제 기작에 근거를 두고 설명하고 있지 못한 형편이다. 따라서, 본 연구자는 이미 발표한 연구결과[3]에서 *Penicillium islandicum*의 mycotoxin(skyrin) 생성을 억제하는 Grapefruit 종자추출물(Grapefruit seed extract : 이하 GFSE로 칭함)을 aflatoxin생성균주인 *Aspergillus parasiticus*의 배양액에 처리하여 곰팡이의 생육 및 aflatoxin 생성저해효과를 조사하였다.

재료 및 방법

GFSE의 조제－브라질산 자몽을 구입하여 그 과육부를 제거하고 분리한 종자들을 수거하여 전보의 방법[3,4]에 따라 일정한 규격의 제품이 되도록 조제하여 사용하였다.

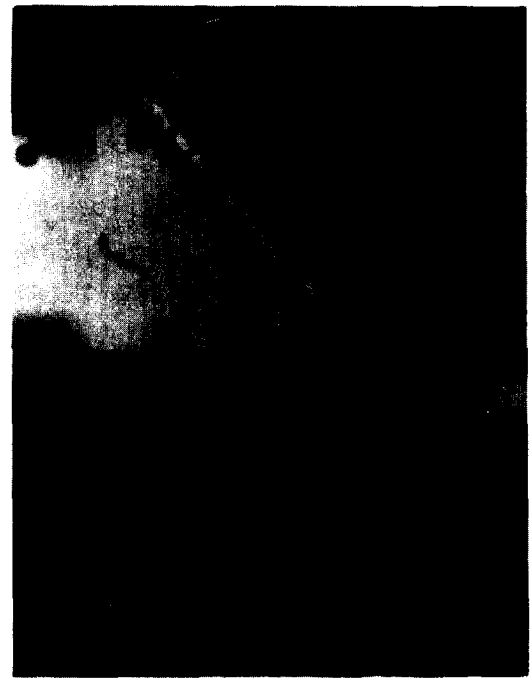

Fig. 1. Photographs of *Aspergillus parasiticus* selected on the culture medium.
A: Conidiophore and conidia, B: Conidia

사용균주 및 배지－본 실험에서 사용·동정된 *Aspergillus parasiticus*(Fig. 1)를 potato dextrose agar 사면배지에서 30 ℃, 5일간 배양하여 포자를 잘 형성한 배양균체에 0.01% sodium sulfate를 가하고 현탁시켜 얻어지는 분생포자를 Reddy[5]의 무기염배지에 접종하여, 30 ℃로 고정되어 있는 진탕배양기에서 200 rpm의 속도로 교반하면서 3일간 배양하였다. 곰팡이 균체는 cheese cloth상에서 먼저 물로 3번 세척하고 저온의 sucose phosphate buffer(pH 7.2)용액속에 담갔다가 Büchner funnel을 사용하여 Whatman No. 2 여과지상에서 여과·건조한 후 냉동시켜 보관하고, 실험용 균체시료로 이용하였다.

GFSE의 처리 및 곰팡이의 생육억제효과 실험－Reddy의 무기염배지에 GFSE 농도가 0(대조구), 500, 1,000, 2,000, 3,000, 4,000 및 5,000 ppm되도록, 추출조제한 GFSE를 첨가하고 가압살균한 다음, 냉동보관 중에 있는 *Aspergillus parasiticus* 배양균체 5 g을 첨가하여 30 ℃에서 7일동안 200 rpm의 속도로 진탕배양하고, 배양균체를 Whatman No. 1로 회수

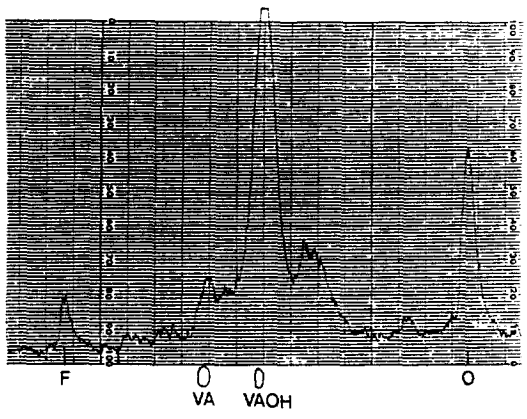

Fig. 2. Densitogram of radioactive peaks of preparatory ^{14}C-versicolorin A and ^{14}C-versicolorin A hemiacetal plotted by a Packard A 7221 Radioactivity scanner. Reference versicolorin A (VA) and versicolorin A hemiacetal(VAOH) were cospotted with the sample.
O: Origin, F: Front

하여 80℃에서 48시간 건조하여 균체중량을 측정함과 동시에, 배양액중에 생성된 aflatoxin 함량을 ELISA법[6]에 의하여 정량하여 GFSE 처리에 의한 곰팡이의 생육 및 aflatoxin 생성에 미치는 저해효과를 조사하였다.

^{14}C-Labeled precursors의 조제－^{14}C-labeled averufin, versiconal acetate, versicolorin A 및 sterigmatocystin은 Lin 등의 방법[7] 및 Hsieh의 방법[8]에 따라 ^{14}C-sodium acetate(0.4 mmol; 1 mCi/mol)를 기질로 한 주입실험결과, 생성·분리하고, ^{14}C-versicolorin A hemiacetal는 ^{14}C-versicolorin A를 dioxane-acetic acid(4 : 1) 및 plantinum 촉매존재하에서 실온에서 12시간 반응시켜 합성하였다. ^{14}C-Versicolorin A와 ^{14}C-versicolorin A hemiacetal은 precoated silica gel-60 plate(Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, U.S.A.)를 사용하여 hexane-acetone-ethyl ether(70 : 30 : 20, v/v/v : HAE solvent system), benzene-acetic acid(95 : 5, v/v) 및 chloroform-acetone-isopropanol(85 : 15 : 2.5, v/v/v : CAI solvent system) 용매계에서 전개시키는 thin-layer chromatography방법으로 정제하고,[9,10] 나머지 모든 ^{14}C-labeled precursors는 Hsieh[8]으로 정제하였다.

모든 precursors의 화학적 순도는 표준품과의 chromatography방법 및 UV-spectrum 비교 등으로 확인, 동정하여 사용하였다. 이와 같은 방법에 의해서 versicolorin A로부터 조제된 versicolorin A hemiacetal를 Packard A 7221 Radioactivity scanner에 걸어 얻어낸 radioactive peaks는 Fig. 2와 같았다.

GFSE처리에 의한 중간대사산물의 aflatoxin으로의 주입억제효과 실험－전술한 방법으로 조제한 ^{14}C-labeled precursors가 aflatoxin으로 주입되는 실험은 Hsieh의 방법[8]에 따라, 무질소 휴지기 세포 배지에 1 l당 1.62g의 포도당을 함유한 배지를 사용하였다. 즉, 50 ml 삼각 플라스크에 배지 10 ml를 넣고, aflatoxin 생합성에 미치는 GFSE의 저해효과를 조사하기 위하여, GFSE의 농도가 2,000 ppm의 농도가 되도록 GFSE 용액을 각 flask에 첨가하고, 대조구로서 일정량을 precursor와 가압살균한 균체를 함유한 flask와 병행하여 30℃에서 72시간 동안 150 rpm의 속도로 진탕배양하였다. 주입실험 목적으로 얻어지는 배양액을 acetone과 chloroform으로 반복 추출하고 실온에서 감압증발건조하여 대사산물의 혼합물을 조제하였다. 증발건조물은 chloroform 또는 acetone으로 다시 용해시켜 HAE 용매계와 CAI 용매계로 precoated silica gel-60 plate(Sigma Chemical Company, St. Louis, MO U.S.A.)상에서 2차원 thin layer chromatography(TLC)법에 의하여 분리, 추출하였다. 대사결과 생성된 ^{14}C-aflatoxin의 thin-layer chromatogram을 긁어내어 15 ml scintillation 용액이 들어 있는 glass vial에 옮겨 놓고 Tri-Carb liquid scintillation spectrometer(Packard Model 2425)를 사용하여 radioactivity를 측정하였다. 이 때 aflatoxin으로의 주입비율은 다음과 같은 공식에 대입하여 산출하였다.

$$\text{Incorporation efficiency}(\%) = \frac{\text{Radioactivity of incorporated aflatoxin}}{\text{Radioactivity of } ^{14}\text{C-labeled precursors added to medium}} \times 100$$

전자현미경을 이용한 곰팡이 세포형태 변화－aflatoxin을 생성하는 *Aspergillus parasiticus*에 대한 GFSE의 항균기작을 조사하기 위하여, 다음과 같은 전자현미경적 방법[11-13]을 이용하였다. 즉, 시험균주를 potato dextrose agar 배지에서 48시간동안 배양한 다음, 배양균주의 일부를 GFSE 500 또는 1,000

ppm용액에 30분간 침지처리하고 원심분리하여 비교적 순수한 공시균주로 분리한 후, 2.5% glutaraldehyde용액(1~4℃, pH 7~7.4)에서 2~4시간동안 진탕·고정하고 1~2% osmium tetroxide용액(1~4℃, pH 7~7.4)에서 30분에 한번씩 흔들어 주며 균주를 고정시켰다. 이어서 phosphate buffer(0.2 M, pH 7.0)로 진탕·수세하여 고정을 마무리한 다음, 50% ethanol과 무수 ethanol로 실온에서 20분씩 진탕하여 탈수하였다. 다시 propylene oxide로 30분간 2회 처리하여 치환하는 작업을 한 후, Epon화합물(포매제 : Epon 812, 경화제 : DDSA·MNA, 가속제 : DMP-30)과 acetone과의 혼합비를 3 : 7, 5 : 5, 7 : 3 또는 100%-Epon 혼합물로 각각 1시간씩 처리하여 포매시켰다. 포매된 재료는 37℃ Electron Microscope(EM) oven에서 12시간, 45℃ EM oven에서 12시간, 60℃ EM oven에서 48시간, 총 72시간 열중합하고 LKB-V형 ultramicrotome으로 0.5~2.0 μm두께의 Semithin section을 제작한 후, toluidine blue로 단염색하고 염색된 균사체중 곰팡이포자(conidiospore)만을 다시, ultrathin section(60~90 nm)으로 박절한 다음, 광학현미경으로 관찰 대상부위를 확인하였다. 동일한 부위에서 은색절편을 제작하여 copper grid(200 mesh)에 부착시킨 다음, 1% uranyle acetate와 lead citrate를 사용하여 double stain으로 염색하고 투과전자현미경(Hitachi H-600 Transmission Electon Microscope)으로 검경하였다. 이때, 500 또는 1,000 ppm의 농도로 희석한 GFSE 용액에 처리한 곰팡이포자를, GFSE용액에 처리하지 않은 대조구 곰팡이포자와 그 형태변화를 비교하여, GFSE용액이 곰팡이 포자구조 및 생체기능변화에 미치는 영향을 중심으로 그 항균작용을 조사하였다.

결과 및 고찰

GFSE처리에 의한 생육 및 aflatoxin 생합성 저해 —GFSE처리에 의한 미생물의 생육 및 aflatoxin생성에 미치는 저해효과를 조사하기 위하여 aflatoxin을 생합성하는 *Aspergillus parasiticus*균체 배양액에 GFSE농도가 0(대조구), 500, 1,000, 2,000, 3,000, 4,000 및 5,000 ppm되도록, GFSE를 Reddy 등의 무기염배지에 첨가하고, 30℃에서 7일동안 200 rpm의 속도로 배양하고, 배양액중의 aflatoxin함량을 정량함과 동시에, 균체를 회수하여 균체중량을 측정한 결과는 Table 1과 같았다.

Table 1. Inhibitory effects of grapefruit seed extract on growth and aflatoxin production in the Reddy's medium by *Aspergillus parastiticus* after 7 days at 30°C

GFSE concentration (ppm)	Mycelial weight		Aflatoxin production	
	Weight (g)	Inhibition (%)	Content (ppm)	Inhibition (%)
	12.5	0	15.7	0
500	8.7	30.4	11.2	28.7
1,000	6.6	47.2	6.6	58.0
2,000	3.8	69.6	3.4	78.3
3,000	2.9	76.8	0.0	100.0
4,000	1.0	92.0	0.0	100.0
5,000	0.0	100.0	0.0	100.0

즉, GFSE 4,000 ppm 농도로 *Aspergillus parasiticus*의 생육을 92% 저해하였으며, 5,000 ppm 농도에서는 곰팡이의 생육을 완전히 저해하였다. 또한, 2,000 ppm 농도에서 aflatoxin의 생성이 78.3% 저해되었고, 3,000 ppm 이상의 GFSE 농도용액에서 aflatoxin의 생성이 완전히 억제되었다. 따라서, GFSE는 일정수준 이상의 농도에서 *Aspergillus parasiticus*의 생육 및 곰팡이의 독소성분 aflatoxin의 생성을 효과적으로 저해함을 알 수 있었다. 이것은 Aguiar 등[14]이 grafruit 종자추출물을 5,000 ppm 농도이상 첨가한 배지에서 3종의 *Aspergillus flavus*의 생육이 크게 억제되고 aflatoxin생합성이 완전히 저해되었다는 결과와 유사한 것으로 나타났다.

Aflatoxin으로의 주입억제효과 —^{14}C-labeled precursor가 aflatoxin으로 전환되는 기작에 미치는 GFSE의 저해효과 실험은 GFSE 농도 2,000 ppm에서 전술한 바와 같은 조건으로 반응시켜 Table 2와 같은 결과를 얻었다. Table 2의 결과는 2,000 ppm의 GFSE가 sodium acetate, averufin, versiconal acetate, versicolorin A hemiacetal 및 sterigmatocystin이 aflatoxin으로 주입되는데 미치는 저해효과를 보여주고 있다.

GFSE이 처리되지 않은 배양액속에서의 ^{14}C-labeled precursor 모두가 aflatoxin으로 주입되는 결과를 보여주었으며, 이것은 본 실험에서 사용한 균주가

Table 2. Incorporation of ^{14}C-labeled sodium acetate, averufin, versiconal acetate, versicolorin A hemiacetal and sterigmatocystin into aflatoxin by *Aspergillus parasiticus* in the level of 2,000 ppm of grapefruit seed extract

Precursor[a]	Incorporated aflatoxin	
	Radioactivity ($\times 10^4$ dpm)	Incorporation efficiency(%)[c]
Sodium acetate	24.0	1.2
Sodium acetate+GFSE	NR[b]	0
Averufin	9.0	25.0
Averufin+GFSE	NR	0
Vericonal acetate	14.4	57.6
Versiconal acetate+GFSE	NR	0
Versicolorin A	20.0	62.5
Versicolorin A+GFSE	12.5	39.1
Versicolorin A hemiacetal	19.7	70.4
Versicolorin A hemiacetal+GFSE	20.1	71.8
Sterigmatocystin	18.2	72.8
Sterigmatocystin+GFSE	15.9	70.9

[a] Amount of ^{14}C-labeled precursors added to the medium: sodium acetate 20 μmol(1.0×10^6 dpm/μmol), averufin 1.5 μmol(2.4×10^5 dpm/μmol), versiconal acetate 1.25 μmol(2.0×10^5 dpm/μmol), versicolorin A hemiacetal 2.0 μmol(1.4×10^5 dpm/μmol), versicolorin A 1.0 μmol(3.2×10^5 dpm/μmol) and sterigmatocystin 0.5 μmol(4.5×10^5 dpm/μmol)

[b] NR: No radioactivity

[c] Incorporation efficiency(%)

$$\frac{\text{Radioactivity of incorporated aflatoxin}}{\text{Radioactivity of } ^{14}C\text{-labeled precursors added to medium}}\times 100$$

정상적인 aflatoxin생합성 능력을 가지고 있음을 지적해주고 있다. GFSE는 ^{14}C-labeled sodium acetate, averufin, versiconal acetate의 aflatoxin으로의 전환반응을 완전히 저해하였으나 versicolorin, versicolorin A hemiacetal, sterigmatocystin의 aflatoxin으로 전환 기작에는 전혀 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다.

Aflatoxin B_1의 생합성 경로는 acetate를 출발물질로 norsolorinic acid → averufin → versiconal acetate → versicolorin A → sterigmatocystin → aflatoxin B_1와 같은 과정을 거친다는 Hsieh의 연구

Fig. 3. Transmission electron micrographs of vesicle attaching conidia of *Aspergillus parasiticus*(A) and that of the microorganism treated with 500 ppm of grapefruit seed extract(B). (magnification: ×6,000)

발표[8,15]가 있은 후, versicolorin A hemiacetal이 aflatoxin 생합성 경로중 중간대사산물이라는 새로운 제안[16-18]이 대두하면서 본 저자와 Anderson[9]은 versicolorin A hemiacetal에서 versicolorin A로의 전환반응과 달리, versicolorin A hemiacetal은 versicolorin C로 전환되고 dihydrosterigmatocystin을 거쳐 aflatoxin B_2로 생합성되는 경로를 발표한 바 있다.

이러한 생합성 경로를 고려해 볼 때, GFSE는 aflatoxin 생합성 경로중 versiconal acetate를 포함한 그 이전의 중간대사산물이 반응기질이 되는 효소반응계를 저해하며 곰팡이의 생육과 아울러, aflatoxin 생합성 경로를 차단하는 것으로 예상할 수 있다.

곰팡이포자의 형태변화—GFSE처리가 aflatoxin 생성균주의 생육에 미치는 영향을 조사하기 위하여 500 ppm의 농도로 GFSE를 처리한 전후의 곰팡이 정낭(vesicle)에 자생한 포자(분생자, conidia)의 세포구조를 비교·검토한 결과는 Fig. 3과 같다. 또한 GFSE 처리에 의한 분생자의 형태변화를 관찰하기 위하여 좀 더 높은 GFSE농도로 처리한 포자내부를 현미경 배율을 높여 촬영한 전자현미경 사진은 Fig. 4와 같다. 즉, aflatoxin을 생합성하는 *Aspergillus parasiticus*의 생육포자인 conidia의 세포구조가 GFSE처리에 의하여 포자형태뿐 아니라, 포자구성 내용물의 유실로 인하여 정상적인 발아기능이 어려워지고 생식수단으로서의 포자구실이 파괴되어 곰팡이를 사멸케 함과 동시에, aflatoxin 생합성 관련 효소의 생산이 중단되는 결과를 초래하는 것으로

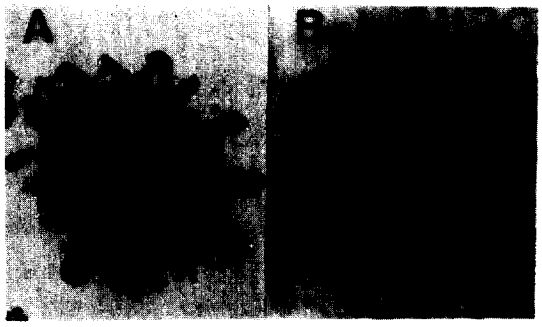

Fig. 4. Transmission electron micrographs of a condiospore of aflatoxin-producing *Aspergillus parasiticus*(A) and that of the microorganism treated with 1,0000 ppm of grapefruit seed extract(B).
(magnification: ×30,000)

나타났다.

GFSE는 미생물의 세포막관련효소활성을 약화시키고 세포의 호흡작용을 저해하여 미생물의 생육을 저해하는 항균기작을 소유하고 있는 것으로 보고되어 있다.[19] GFSE에는 ascorbic acid와 함께, bioflavonoid인 narigin이 주요성분으로 함유되어 있고, 특히 narigin은 금속복합체형성 능력이 있어 미생물 분비효소나 세포막 기능에 영향을 주어 정균작용을 하는 성분으로 알려져 있다.

물론, 이와같은 연구결과는 *in vitro* 실험에 의존한 임상학적 처리효과에 근거를 둔 발표내용이므로 GFSE의 작용기작을 판명하기 위해서는 좀 더 생화학적이고, 처리미생물의 생리 및 구조에 역점을 둔 연구가 진행되어야할 필요가 있겠으나, 본 연구결과로 미루어, GFSE처리는 미생물 세포막 구조를 변형시켜 세포막 기능이 소실됨에 따라 미생물생육 및 정균효과를 유도할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 1991년도 산학협동재단 학술연구비 지원에 의하여 수행된 결과의 일부로서 이에 깊은 감사를 드립니다.

국문요약

농산물 및 그 가공식품을 수확·저장·가공하는 기간중에 *Aspergillus parasiticus*가 오염되어 aflatoxin을 생성하는 것을 방지할 목적으로 생육배지에 grapefruit 종자추출물(GFSE)을 처리하여 곰팡이의 생육 및 aflatoxin 생합성을 저해하는 뚜렷한 효과를 관찰할 수 있었다. 4,000 ppm의 GFSE농도 처리로 *Aspergillus parasiticus*의 생육을 92% 저해하였으며, 5,000 ppm 농도에서는 곰팡이 생육을 완전히 저해하였고 3,000 ppm 이상의 농도에서 aflatoxin의 생성을 100% 억제하였다. 한편, GFSE처리에 의하여 aflatoxin 생합성 경로중, averufin, versiconal acetate 등의 중간대사산물이 aflatoxin으로 주입되는 것이 완전히 저해된 반면, versicolorin A, versicolorin A hemiacetal, sterigmatocystin 등은 aflatoxin으로 전환되는 결과를 보여주어 GFSE는 versiconal acetate를 포함한 그 이전의 중간대사물이 반응기질이 되는 효소반응계를 저해하는 것으로 나타났다. 전자현미경을 이용한 곰팡이균체 및 포자의 형태변화는 GFSE처리에 의하여 세포막기능에 파괴되어 세포구성 내용물이 유실되고 곰팡이가 사멸하고 aflatoxin 생합성 기작이 중단되는 결과를 초래하는 것으로 나타났다.

참고문헌

1. 김용화, 황보정숙, 이서래 : 몇가지 한국식품중 aflatoxin의 검출, 한국식품과 학회지, **9**, 73 (1977).
2. 정덕화, 강호조, 하기수, 김성영, James J. Pestka : 영남지방 농산물에 대한 위생학적 연구, 한국식품위생학회지, **4**(3), 165-184 (1989).
3. 조성환, 서일원, 최종덕 : 자몽추출물인 *Penicillum islandicum*의 생육 및 독소성분 skyrin 생합성에 미치는 저해효과, 한국농화학회지, **32**(2), 169-173 (1990).
4. Harich, J: DF-100. U.S. Patent 1, 354, 818, FDA No. R-0013982 (1982).
5. Reddy, T.V., Viswanathan, L. and Venkitasubramanian, T.A.: High aflatoxin production on a chemically defined medium, *Appl. Microbiol.*, **22**, 393 (1971).
6. Warner, R., Ram, B.P., Hart, L.P. and Pestka, J.J. : Screening for zearalenone in corn by competitive enzyme-linked immunosorbent assay, *J. Agri. Food Chem.*, **34**, 714-717 (1986).
7. Lin, M.T., Hsieh, D.P.H., Yao, R.C. and Donkers-

loot, J.A.: Conversion of averufin into aflatoxins by *Aspergillus parasiticus, Biochemistry,* **12**, 5167-5171 (1973).

8. Hsieh, D.P.H., Lin, M.T., Yao, R.C. and Singh, R.: Biosynthesis of aflatoxin. Conversion of norsolinic acid and other hypothetical intermediate into aflatoxin B_1, *J. Agric. Food Chem.,* **24**(6), 1170 (1976).
9. Anderson, J.A., Chung, C.H. and Cho, S.H.: Versicolorin A hemiacetal, hydroxydihydrosterigmatocystin and aflatoxin G_{2a} reductase activity in extract from *Aspergillus parasiticus, Mycopathologia* III, 39-45 (1990).
10. 조성환, 서일원 : *Aspergillus flavus*에 의한 versicolorin C의 생합성, 경상대학교 논문집, **27**(2), 199-208 (1988).
11. Bendayan, M.: Protein-A-gold electron microscopic immunochemistry; methods, application and limitations, *J. Elect. Microsc. Tech.,* **1**, 243-270 (1984).
12. Eldred, W.D., Charles, Z., Harvey, J.K. and Stephan, Y.: Comparison of fixation and penetration enhancement techniques for use in ultrastructural immunocytochemistry, *J. Histochem. Cytochem.,* **31** (2), 285-292 (1983).
13. Altman, L.G., Schneider, B.G. and Papaermaster, D.S.: Rapid embedding of tissues in Lowicryl K4 M for immuncelectron microscopy, *J. Histochem. Cytochem.,* **32**(11), 1217-1223 (1984)
14. Aguiar, L.A.B. and Bastos, S.T.G.: The effect of the extract of grapefruit seed on mycotoxin producing fungi of the *Aspergillus flavus* group and *Aspergillus ochraceus* group, *Fitopathologia Brasileira,* 7, 573 (1982).
15. Singh, R. and Hsieh, D.P.H.: Aflatoxin biosynthetic pathway: Elucidation by using blocked mutants of *Aspergillus parasiticus, Achives of Biochemstry and Biophsics,* **178**, 285-292 (1977).
16. Wan, N.C. and Hsieh, D.P.H.: Enzymatic formation of the bisfuran structure in aflatoxin biosynthesis, *Appl. Envir. Microbiol.,* **39**, 109-112 (1980).
17. Anderson, M.S. and Dutton, M.F.: Biosynthesis of versicolorin A, *Appl. Envir. Microbiol.,* **40**, 706-709 (1980).
18. Dutton, M.F. and Anderson, M.S.: Role of versicolorin A and its derivaties in aflatoxin biosynthesis, *Appl. Envir. Microbiol.,* **43**, 548-551 (1982)
19. Wyatt, R.D.: Mode of action of grapeful seed extract, A report submitted to Dr. Jacob Harich (1990).