

紅蔘 Saponin이 *Aspergillus flavus* NRRL 3357 의 發育과 Aflatoxin 生産에 미치는 效果

疫學調査科

朴孝珍·閔尚基·河相泰·李秉圭·裴基哲

Effects on growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* NRRL 3357 by red ginseng saponin.

Department of Epidemiology

H.J. Park, S.K. Min, S.T. Ha, B.G. Lee, K.C. Bae

Abstract

The study carried out for the purpose to finding effects of the saponin that extracted from red ginseng on the growth of, aflatoxins production by, and protein patterns of *Aspergillus flavus* NRRL 3357. *A. flavus* with 10^6 conidia were grown at 30°C for 7 days on the enriched medium.

Mycelial growth and pH changes of medium which cultured the mold, were similar to the pH of the control group. However, aflatoxin which produced by the mold were less than that of the control in all concentrations of the saponin. To be more specific, 0.3% of the saponin inhibited production of aflatoxin B₁ and G₁ to the extent of 31.6 and 21% of the control. The protein peaks of *A. flavus* at the fourth day of the culture were shown high intensity near the level of 14,300 daltons. However, the mold which cultured in the medium containing the saponin showed low intensity of protein than that of the control group on all molecular weight.

I. 緒 論

곰팡이類의 代謝産物이 사람과 동물에게 急·慢性障害을 유발하는 物質群을 總稱하여 眞菌毒이라고 하고 이 毒에 의한 症候群을 眞菌中毒症이라 한다.

이와같이 眞菌毒 중에 크게 問題가 되고 있는 것이 aflatoxin이며 1960年 英國에서 發生한 turkey X-disease가 Brazil에서 輸入한 땅콩에 寄生한 곰팡이 *Aspergillus flavus*의 代謝産物인 螢光生性 aflatoxin의 原因인 것으로 밝혀졌다.

그후 20년이 지난 현재 毒素의 生産菌株는 *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*로 보고되어 있다.

이들 곰팡이는 世界的인 分布를 하고 특히 온대와 아열대의 수분이 많고 상대습도가 높은 지역의 식물에 잘 번식하며, 發育에 必要한 最低 RH는 82%이고 aflatoxin 生産에 最適 RH는 89~99±1%이며 發育을 위한 最適溫度 범위는 25~35°C로 보고되어 있다.

pH 4 이하에서는 發育이 지연되며 5.5~6.0을 最適범위로 한다. 炭素源으로 sucrose, glucose, fructose, xylose, ribose, glycerol등을 이용하고 窒素源으로 ammonium sulfate, potassium nitrate등을 이용하고 Zn은 aflatoxin生産 促進因子로 알려졌으며 Fe, Mn, Ba, thiamine biotin등을 요구한다.

*Aspergillus flavus*는 곡물이나 堅果類 기타 많은 작물 등에 寄生하여 發育하고 작물의 성숙 정도, 發育狀態, 결실, 수확, 貯藏 및 加工 與件에 따라서 汚染될 수 있으며 汚染된 후 증식하면서 毒素을 生産하고 生産된 毒素은 인간과 동물에게 被害를 준다.

이러한 aflatoxin은 많은 種類가 밝혀져 있으나 사람과 동물에게 發痛力을 가지고 毒性이 강한 aflatoxin B₁, M₁ 및 G₁이 問題가 된다.

Aflatoxin B₁, G₁ 및 M₁의 구조식은 Fig. 1과 같으며 일반적인 性狀은 Table 1과 같다.

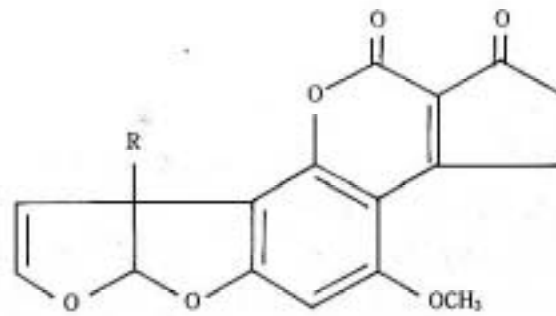
Aflatoxin으로 인한 生物學的 影響은 황달, 肝癌, 肝機能 損傷등의 急性症勢와 동물의 성장을 減少, 疾病에 대한 抵抗力 減少 등의 慢性症勢를 유발한다.

Renshung는 India에서 400여명의 환자 중 106명이 死亡한 경우를 疫學的으로 論證하고 태국에서는 129명의 환자가(1969) Rey 症候群으로 보고되고 入院환자중 80%가 死亡하였다. 이로써 사람에게도 건강상의 危害를 초래한 것이 밝혀졌다.

人蔘은 東洋에서 2000年前부터 強壯·強精의 效果를 가지고 있는 것으로 알려져 漢方에서 널리 使用되어 왔다.

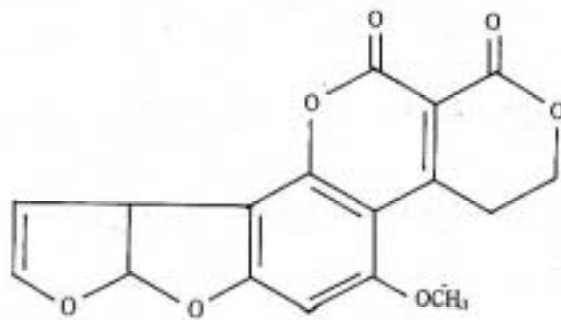
紅蔘 Saponin이 *A. parasiticus*의 發育 및 aflatoxin 生産을 현저하게 抑制한 것으로 Bahk과 Marth(1983)가 밝히고 있으나 *A. flavus*에 대해서는 報告된 바가 없다.

著者は 紅蔘 saponin을 이용하여 *A. flavus*의 發育 및 aflatoxin 代謝에 미치는 影響을 규명



Aflatoxin B₁ R=H

Aflatoxin M₁ R=OH



Aflatoxin G₁

Fig. 1 Structures of aflatoxin B₁, G₁, and M₁

하고자 한다.

Table 1. Chemical and physical property of 3 aflatoxins selected

Aflatoxin	Molecular formular	Molecular weight	Melting point	UV absorption (362~363nm)	Fluorescence under UV
AFB ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	268 - 269	21,800	Blue
AFG ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	244 - 246	16,100	Green
AFM ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	299	19,000	Blue

II. 材料 및 方法

1. 菌株 및 培地造成

본 實驗에 사용된 菌株는 미국 농부생산하 North Regional Research Center에서 분양된 *Aspergillus flavus* NRRL 3357로서 aflatoxin生産力이 뛰어난 菌株이다.

供試菌株의 教育 및 aflatoxins 生産에 最適條件을 부여한 후 紅蓼사포닌의 效果를 측정하기 위하여 強化培地를 사용하였으며 培地의 組成은 Table 2와 같다.

Table 2. Composition of the enriched medium(per liter)

Glucose	60g	$Fe_2(SO_4)_3 \cdot 6H_2O$	10mg
$(NH_4)_2SO_4$	4g	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.3mg
KH_2PO_4	10g	$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.11mg
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2g	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	17.6mg
$(Na_2B_4O_7) \cdot 10H_2O$	0.7mg	2% of yeast extract	
$(NH_4)_2O \cdot 4H_2O$	0.5mg	pH was adjusted to 5.5 with 1N NaOH	

2. 紅蓼 saponin의 분리

實驗에 사용된 紅蓼 saponin은 Fig. 2와 같은 方法으로 추출하였다. 紅蓼粉末에 5배량의 80% ethanol(80°C)로 3시간 동안 2회추출시킨 다음 여과하여 그 여액을 減壓蒸溜시킨 다음 농축액에 물 5배량을 가하여 수용액을 만든다.

이 수용액을 ethyl ether로 脫脂시킨 후 다시 水層을 水飽和 butanol로 추출하여, 粗사포닌을 butanol層으로 이행시키고 水溶性 成分을 除去하기 위하여 충분히 水洗한 다음 減壓건조하여 粉末狀의 粗사포닌을 얻었다.

紅蓼 saponin을 증류수에 용해시켜 滅菌된 培地에 saponin含量이 0.3%, 0.1%, 0.05%가 되도록 첨가했다.

3. 培養 및 發育測定

Mycological agar에 保存된 菌體를 2회에 걸쳐 活性化시킨 후 mycological agar(Difco 製) 배지를 이용하여 28°C에서 7日間 培養하여 形成된 胞子를 滅菌된 0.1% Tween 80 용액에서 수확하였다.

Conidia수는 plate count method(pouring)를 이용하였다. 125ml의 Erlenmeyer flask에 28 ml의 broth와 紅蔘 saponin 1ml 그리고 10^6 conidia가 포함된 0.1% Tween 80 suspension을 1ml넣어서 28°C의 暗所에서 7일간 培養했다.

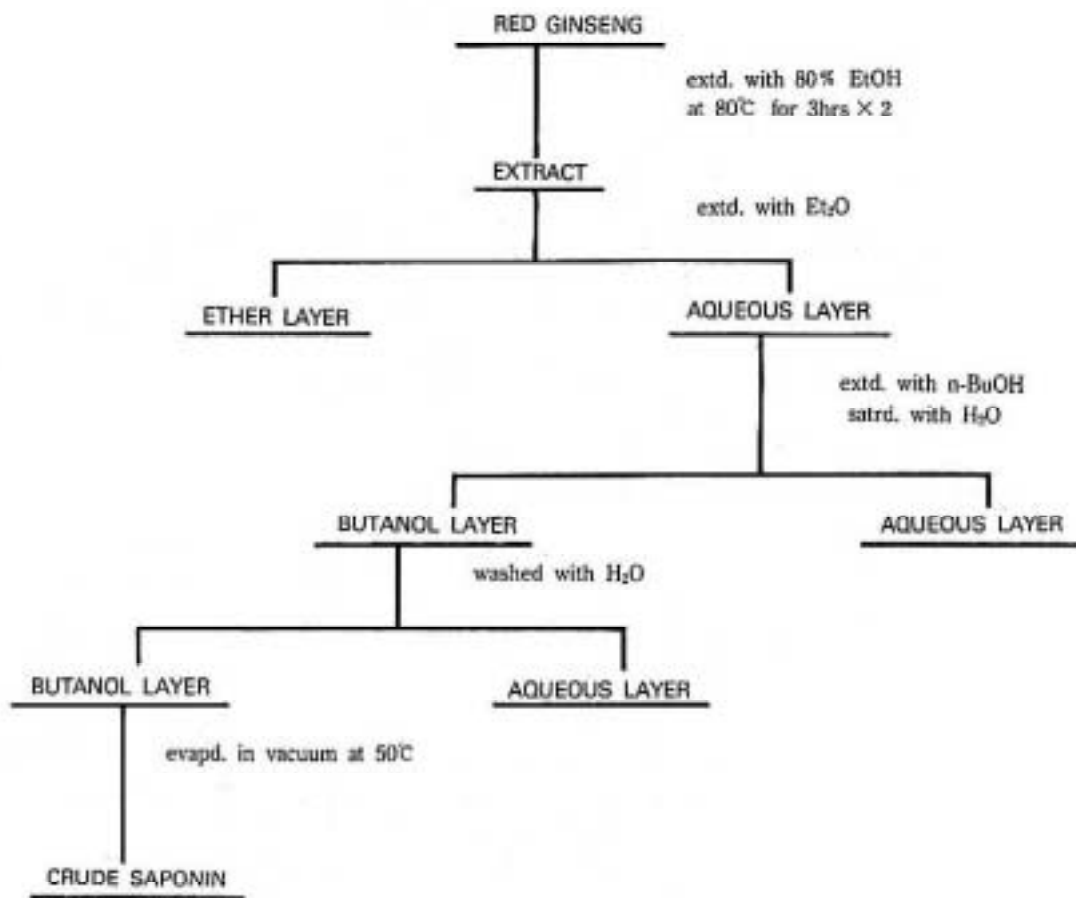


Fig. 2 Flow sheet for extraction and separation of crude saponin from red ginseng.

4. 培地の pH 및 菌體發育測定

培地の pH는 pH meter(Model 10, Corning Scientific Instruments, Corning, New York)를 사용하였으며 이때 mycelia mat 아래층의培地가 pH측정에 이용되었다.

*A. flavus*의 發育을 측정하기 위해 乾燥菌體測定法(Fig. 3)을 이용하였다.

Whatman No. 1 여과지(직경 12.5cm)를 modified Büchner funnel에 고정시킨후 125ml Erlenmeyer flask에 培養된 mycelia와 培地를 여과한 다음 5ml 정도의 증류수로서 培養 flask와 mycelia를 2-3회 세척한 후 여과지를 Büchner funnel에서 분리하여 50°C에서 24시간 乾燥시키고 desiccator에 24시간 放置하여 重量을 測定하여 發育정도를 把握하였다.

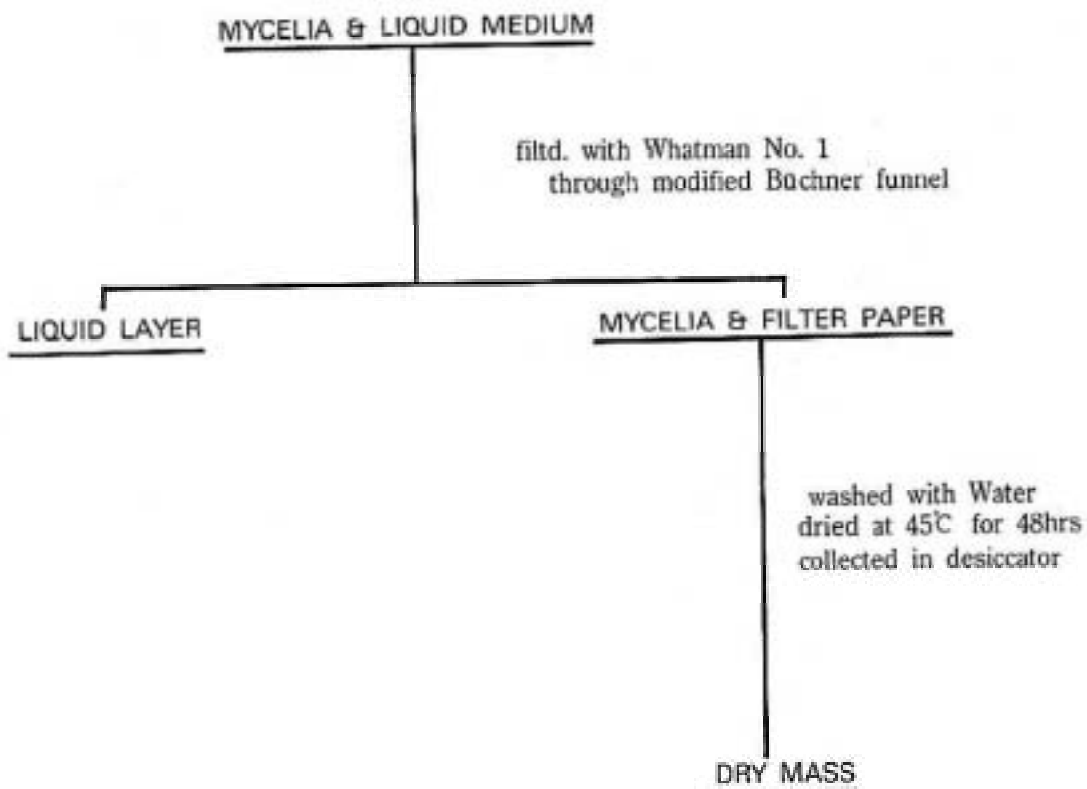


Fig. 3 Procedure for preparation of mycelial dry weight.

5. Aflatoxin의 抽出 및 定量

Aflatoxin 抽出은 Fig. 4의 方法과 같이 發育測定에 사용된 菌體와 여파지를 除外한 나머지를 40ml의 chloroform으로써 잔류 aflatoxin을 溶解시키고 그 용해된 것을 modified Büchner funnel을 통과시켜 separate funnel에 수집하고 그 내용물을 2분간 잘 흔든 다음 定置하여 chloroform phase를 round bottom flask에 수집하였다.

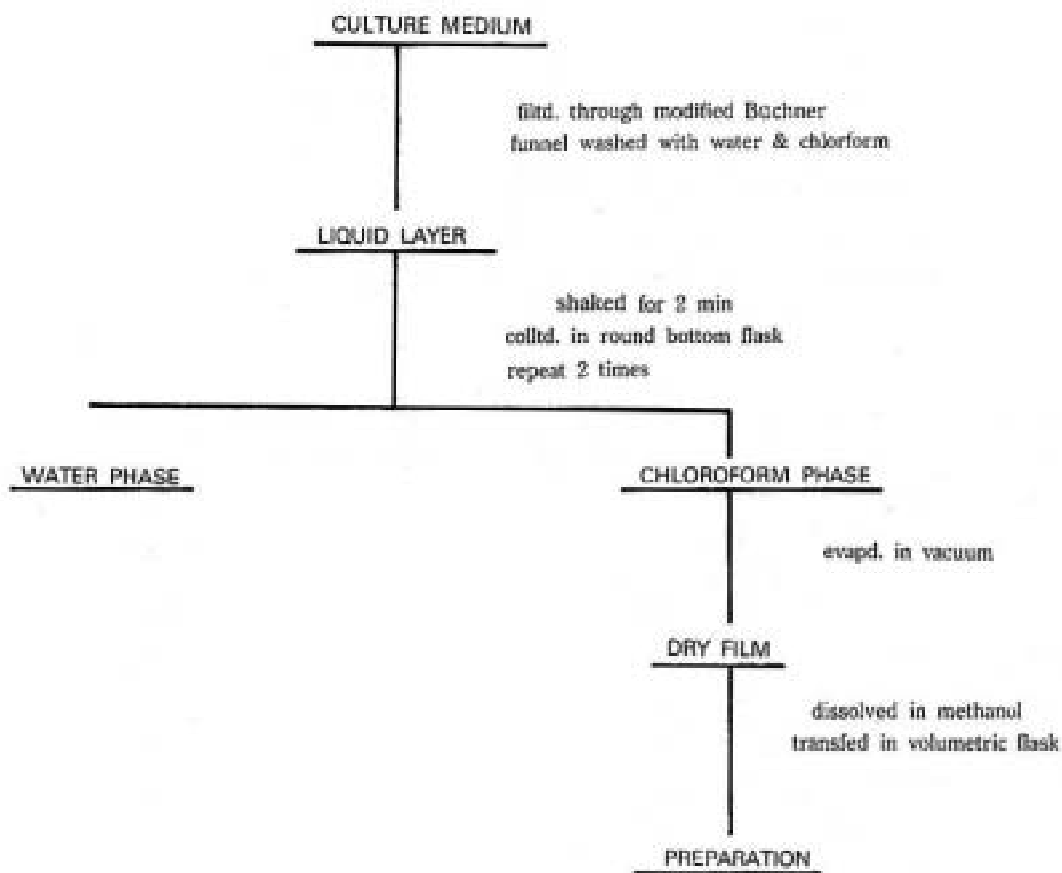
완전 추출을 위하여 위와 같은 방법으로 2회 반복 추출하여 round bottom flask에 수집된 120ml의 용액을 vacuum evaporator(Model R110, Büchi, Switzerland)로써 chloroform을 除去시킨후 남은 film을 methanol에 용해시켜 volumetric flask(25, 50, 100ml)에 옮겨 定量에 使用하였다.

Aflatoxin의 定量은 高速液體 크로마토그래피법을 이용하였는데 이때 사용한 HPLC(Waters Associates, Milford, MA.)로 absorbance detector(model 440)와 data module(model 730)을 이용하여 定量하였으며, 이때 사용한 column은 逆相column인 μ -Bondapak C₁₈이었다.

移動相으로는 acetonitrile/water(35 + 65, v/v)을, aflatoxin 標準品은 Sigma製品을 사용하여 Fig. 5와 같이 retention time과 peak area를 얻어 regression equation과 r²를 얻었다.

6. Aflatoxin 生産指數

*A.Flarus*의 aflatoxin축적 能力을 測定하기 위하여 2차 대사산물의 生産指數를 算定하는 다음과 같은 Brown과 Vass의 式을 이용하여 指數를 얻었다.



APT. determin. w/HPLC

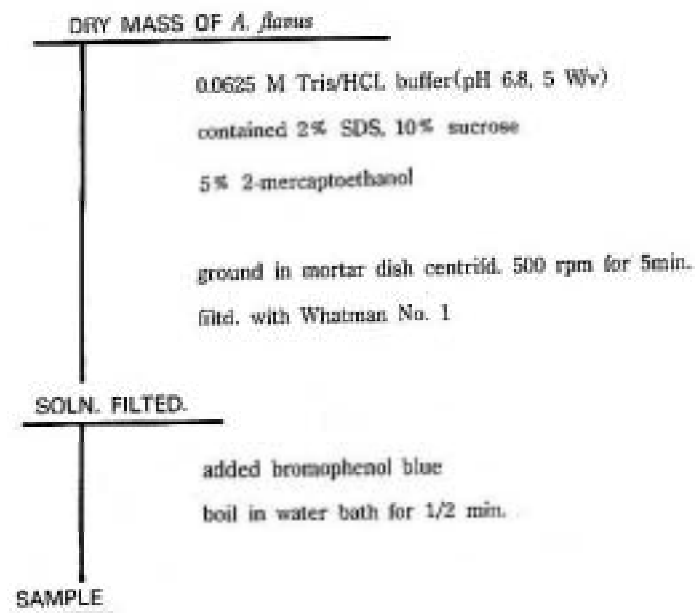
Fluorescence detector(M. 440)

Column : μ -Bondapak C₁₈

Elut. solvent : acetonitrile/water(35+65, v/v)

Water Assn. Milford, MA

Fig. 4 Procedure for preparation of aflatoxin extraction and aflatoxin determination.



MOLECULAR WEIGHT MARKER (SIGMA)

Lysogyme	14,300 dalton
β -lactoglobulin	18,400 dalton
Trypsinogen	24,000 dalton
Egg albumin	45,000 dalton
Bovine albumin	66,000 dalton

Use : Vertical slabgel apparatus (LKB)

Discontinuous buffer system; Laemmli method (1970)

10% SDS/polyacrylamide gel, 100V 3h at 4°C

Stained with Coomassie Brilliant Blue R250 (Sigma)

Densitometer (DMU-33c, Toyo) density range 2.0, 570nm

Fig. 6 Procedure and method for electrophoresis.

7. 電氣泳動

*A.flavus*의 發育을 測定한 乾燥菌體를 Fig. 6의 方法에 따라 2% SDS, 10% sucrose, 5% 2-mercaptoethand을 含有한 0.0625M Tris/Hcl buffer(pH6.8)를 5백(w/v)넣고 유발에 갈았다. 이것을 2500rpm으로 5분동안 원심분리시킨후 그 上澄液을 Whatman No. 1여과지로 여과하여 0.002% bromophenol blue를 加한 다음 끓는물에서 90초동안 중탕하여 시료로 사용하였다.

Molecular weight marker로써 lysozyme;14,300 dalton, β -lacto globulin;18,400 dalton, trypsinogen;24,000 dalton, albumin egg;45,000 dalton, albumin bovine;66,000 dalton(Sigma 製品)을 이용하였으며 이들을 試料의 方法과 같이 전처리하여 使用하였다.

電氣泳動 kit는 vertical slab gel apparatus (model 2001 LKB, Sweden)를 사용하였으며 Laemmli(1970) 方法에 의하여 discontinuous buffer system을 이용하였고 gel은 SDS/polyacrylamide를 사용하였다.

電氣泳動은 100V(power supply;model 2003, LKB)로 3시간동안 4℃에서 行하였고 단백질 패턴의 染色은 coomassie brilliant blue(R250, Sigma)로 하였다.

染色된 gel은 densitometer(DMU-33C Toyo;Japan)에서 density range 1.5, 파장 570nm로 scanning하였다.

III. 結果 및 考察

1. 菌體의 發育 및 培地의 pH變化

強化培地에서 紅蓼 saponin을 添加하여 30℃에서 7일간 培養한 *A.flavus*의 發育은 Fig. 7과 같다.

紅蓼 saponin 添加地에서 菌體發育은 對照群보다 일반적으로 모두 發育이 저조했고 紅蓼 saponin 0.3% 添加培地에서 發育이 특히 저조했다.

*A.flavus*의 發育에 이용된 培地의 pH는 Fig. 8과 같으며 일반적으로 培養 4일째의 pH는 최저水準에 이르고, 이어 5일째 부터는 다시 상승하여 거의 대등한 상태를 보이나 對照群보다는 높게 나타났다. 그런데 Bahk과 Marth의 研究에서 나타난 紅蓼 seponin 0.36% 添加培地는 全培養期間 동안(9日間) pH의 變化가 거의 없었던 것과는 상당한 차이를 나타내고 있었다.

2. Aflatoxin의 生産

Aflatoxin生産能力은 *A.flavus*가 급격히 증식하면 aflatoxin量도 급격히 증가하고 停止期에 도달하면 급격히 감소됨을 볼 수 있었다.

한편 Fig. 9 및 Table 3에서와 같이 aflatoxin B₁의 生産量은 紅蔘 saponin 0.3의 添加培地에서는 對照群(1.00%)보다 30.16%만이 生産되었고, 0.1%, 0.05%에서도 58.96%, 72%로 對照群보다 낮게 生産됨으로서 紅蔘 사포닌이 aflatoxin B₁의 生産을 抑制하고 있음을 알 수 있었다.

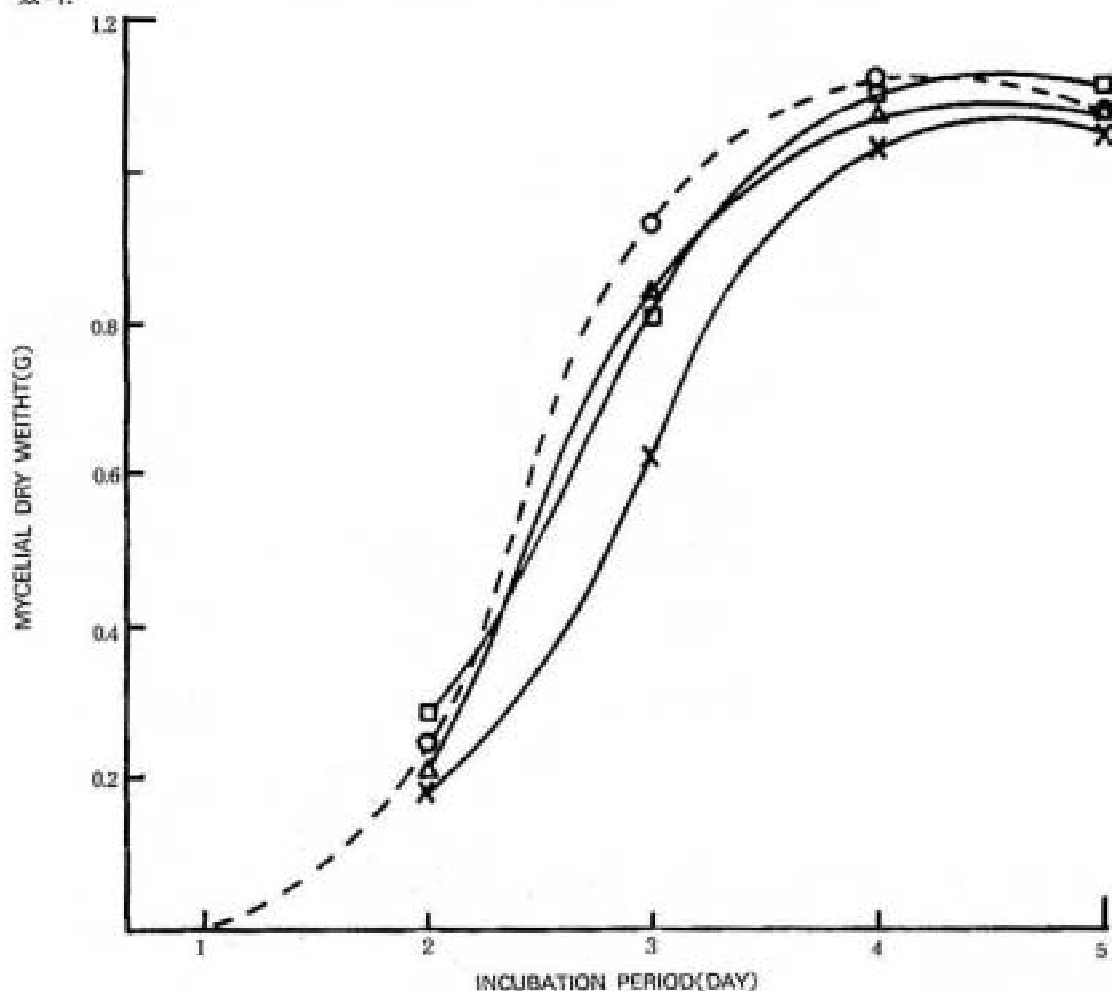


Fig. 7 Mycelial dry weight(g/30 ml of medium) of *A. flavus* NRRL 3357 grown at 30°C when the medium contained various concentration of red ginseng saponin and was inoculated with 10^6 conidia. The concentrations of the saponin are 0.3% (X-X), 0.1% (□-□), 0.05% (△-△), and control(○-○).

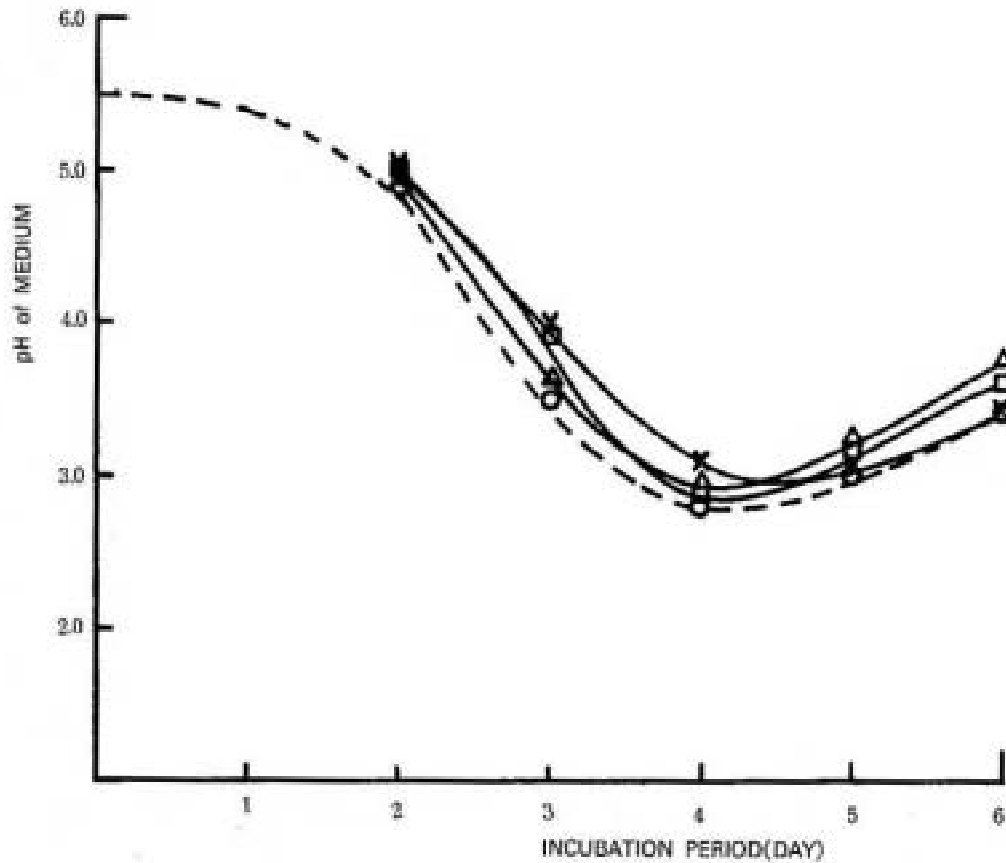


Fig. 8 Changes in pH of the medium caused by growth of *A. flavus* at 30°C. Symbols are the same as in the Fig. 7.

Fig. 10 및 Table 3에서 aflatoxin G₁ 生産은 紅蓼 添加培地가 對照群에 비해 0.3% 添加에 서는 7.12%, 그리고 0.1%, 0.05% 添加培地에서 aflatoxin 生産을 현저하게 抑制시킨 것으로 나타났다.

3. Aflatoxin 生産指數

Aflatoxin生産量과 菌體의 發育정도는 密接한 관계가 있으므로 Brown과 Vass model에 의 하여 最大發育值에 대한 最大 aflatoxin속직량을 測定하여 구한 指數는 Table 4와 같다. 모든 紅蓼 saponin 添加培地가 농도에 관계없이 aflatoxin 生産能力이 對照群에 미치지 못하고 紅蓼 saponin 0.3% 添加培地는 aflatoxin B₁이 對照群의 $\frac{1}{3}$ 정도인 31.75%, aflatoxin G₁이 對照群

의 $\frac{1}{50}$ 정도인 2.12%로서 抑制效果를 나타내었으며, 紅蔘 saponin 0.1%, 0.05%도 對照群보다 낮은 aflatoxin B₁이 60.03%, 78.29%, aflatoxin G₁이 6.0%, 18.78%로 aflatoxin G₁은 거의 生成되지 않았다.

4. 菌體 단백질 패턴

*A. flavus*의 菌體 단백질 패턴을 비교하기 위해 發育과 毒素 産生이 가장 많았던 4일째의 菌體에 대해 電氣泳動을 실시한 결과는 Fig. 11과 같았다.

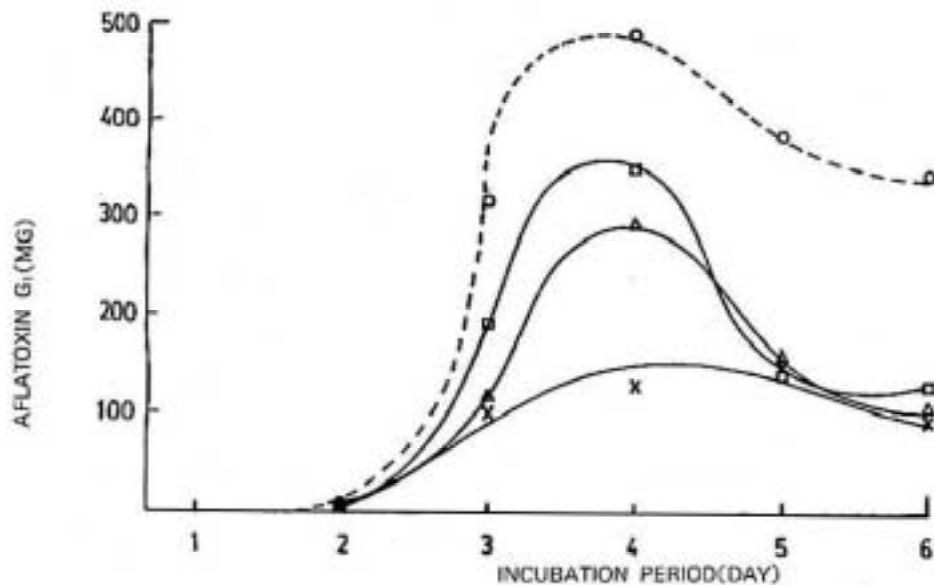


Fig. 9 Aflatoxin B₁($\mu\text{g}/30\text{ml}$ of medium) accumulated by *A. flavus* at 30°C when the medium contained various concentrations of red ginseng saponin and was inoculated with 10⁶ conidia. Symbols are the same as in the Fig. 7

紅蔘 saponin의 농도별 조사에 있어서 일반적으로 높게 나타나는 peak들은 분자량 약66,000 dalton과 약40,000dalton이었으나, 분자량이 약24,000dalton이하의 단백질을 많이 생성함을 알 수 있었다. 이것은 분자량이 큰 단백질보다 비교적 저분자를 구성하고 있는 단백질 합성이 이 菌株에서는 왕성함을 알 수 있다. 그리고 紅蔘 saponin 添加培地에서 發育한 菌體는 saponin 添加농도가 증가될수록 全體 단백질 분자량 14,000~66,000daltons에서 그 intensity가 대조군보다 낮게 나타났으며 이것은 이 부근의 단백질 생성이 抑制되었거나 구성이 破壞 혹은 전환된 것으로 보여진다.

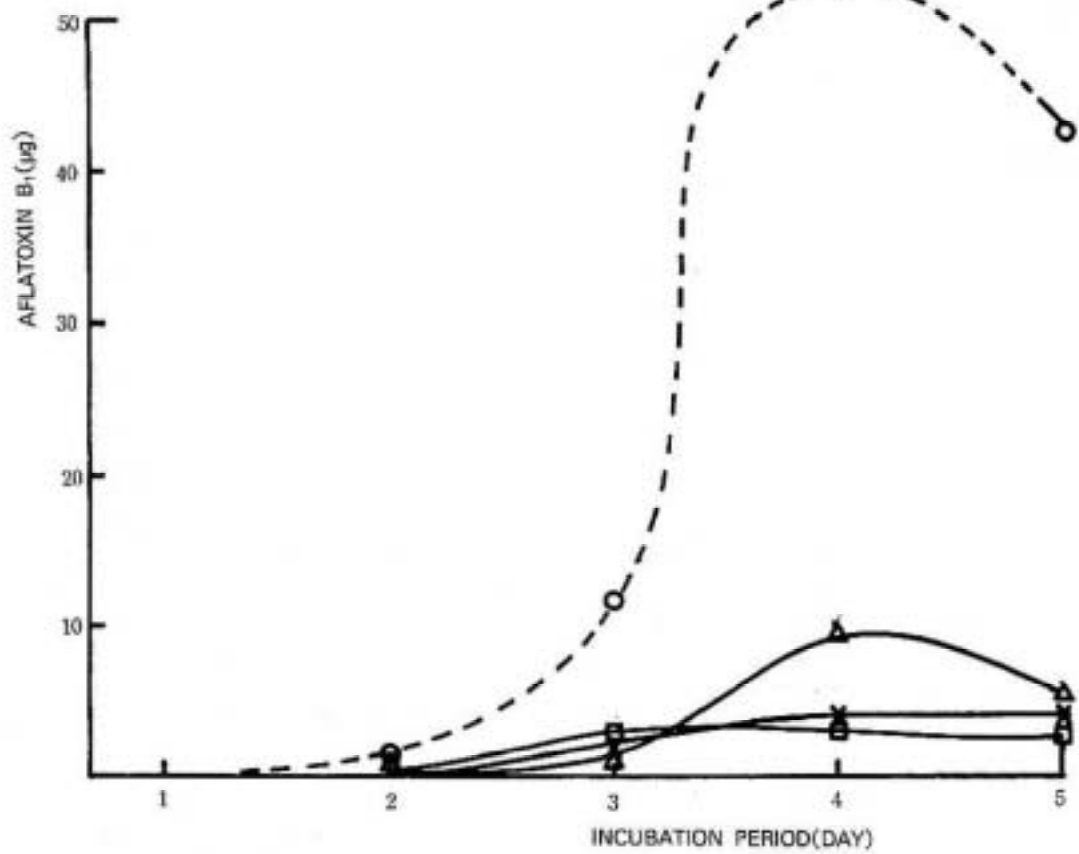


Fig. 10 Aflatoxin G₁ (9 /30ml of medium) accumulated by *A. flavus* at 30°C. Symbols are the same as in Fig. 7.

Table 3 Growth, pH and aflatoxin production by *A. flavus* NRRL 3357 at 30°C for 7 day in a medium containing red ginseng saponin

Treatment	Dry weight ^a (g /30ml)	pH of medium ^b	Aflatoxin(g /30ml of medium) ^c	
			B _i	G _i
Control	1.12(4) ^d	2.81(4)	494.9 (4)	52.78(4)
Saponin*	1.07(4)	3.08(5)	149.28(5)	3.76(5)
Saponin**	1.10(4)	2.97(4)	291.78(4)	3.11(4)
Saponin***	1.11(4)	2.98(4)	356.33(4)	9.12(4)

a : Maximum mycelial dry weight during growth of the mold.

b : Minimum pH of the medium.

c : Maximum aflatoxin accumulated.

d : The numbers in parentheses indicate the day of incubation for max. mycelial dry weight, min. pH of the medium or max. aflatoxin accumulated.

* 0.3% of saponin contained in the medium.

** 0.1% of saponin contained

*** 0.05% of saponin contained.

Table 4 Ability for aflatoxin production by *A. flavus* NRRL 3357 in the medium containing red ginseng saponin

Treatment	Index for maximum aflatoxin production			
	B _i	% of control	G _i	% of control
Control	441.875	100.00	47.121	100.00
Saponin*	139.51	31.57	3.513	2.12
Saponin**	265.25	60.03	2.827	6.0
Saponin***	345.947	78.29	8.85	18.78

* indicates 0.3% of saponin contained in the medium.

** indicates 0.1% of saponin.

*** indicates 0.05% of saponin.

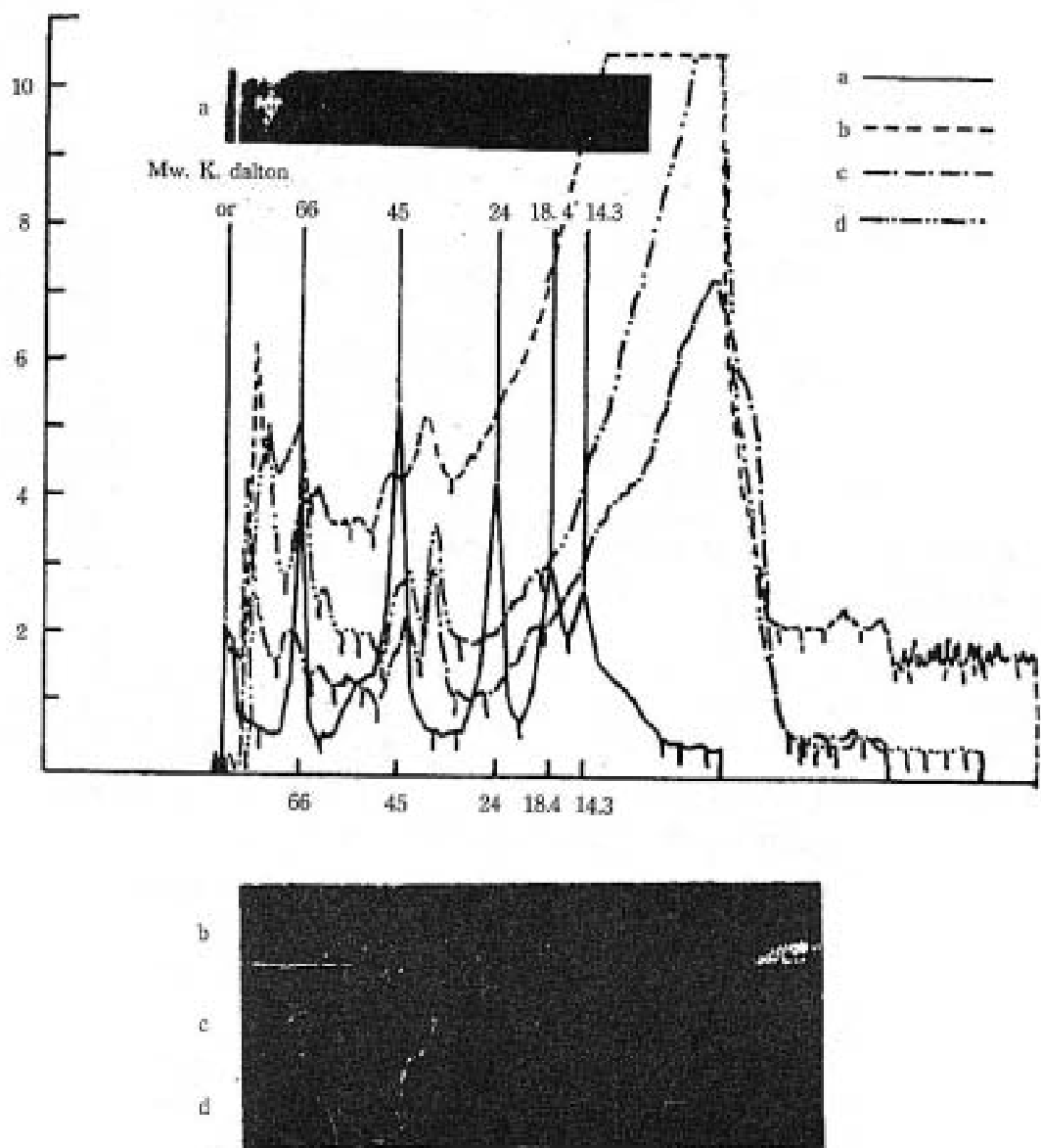


Fig. 11. The protein patterns of *A. flavus* grown at 30°C when the medium contained various concentrations of red ginseng saponin. Concentrations are 0.3% (c), 0.05% (d), control (b), and marker (a).

IV. 結 論

A. flavus NRRL 3357의發育과發癌物質인 aflatoxin 生産에 最적인 條件을 부여하여 紅蓼 saponin을 添加한 培地에서 배양한 菌體의發育과 aflatoxin 生産能力을 조사하였다.

Aflatoxin정량은 HPLC를 이용하였고 菌體發育은 乾燥菌體 測定法에 의하여 실시하였다. 紅蓼 saponin 添加培地에서 菌體發育은 對照群과 큰 차이가 없었고 배양 4일째에 최대발육을 나타내었다. Aflatoxin 生産能力은 紅蓼 saponin 添加培地에서 aflatoxin B₁과 G₁이 각각 對照群의 31.6%, 2.12%로 抑制效果로 나타내었다.

菌體發育 및 毒素生産에 의한 培地の pH 變化는 거의 大體한 차이를 보이나 對照群보다는 높게 나타났다. 電氣泳動은 Laemmli法(1970)에 의하여 SDS/polyacrylamide gel을 이용하였으며 紅蓼 saponin 添加培地에서發育한 菌體단백질 패턴의 intensity는 對照群보다 낮게 나타났다.

A. flavus 菌體단백질은 비교적 낮은 분자량을 가진 단백질들의 생성이 많았다. 따라서 紅蓼 saponin은 *in vitro* 實驗에서 aflatoxin B₁ 및 G₁의 生成을 效果的으로 抑制함을 알 수 있었다.

參 考 文 獻

1. Goldblatt, L. A., Aflatoxin, Academic Press, 472, (1969)
2. Loosemore, R. M. and Harding, J. D. J., A toxic factor in Brazilian groundnut causing liver damage in pigs. Vet. Record, 73 : 1362-1364(1961)
3. Loosemore, R. M. and Markson, L. M., Poisoning of cattle by Brazilian groundnut meal. Vet. Record, 73 : 813-814(1961)
4. Allcroft, R., Carnaghan, R. B. A., Sargeant, K., and O'Kelly, J. A., A toxic factor in Brazilian groundnut meal. Vet. Record, 73 : 418-429(1961)
5. Patterson, D. S. P., Structure, metabolism, and toxicity of aflatoxin. p158-186(1969)
6. Council for agricultural science and technology, aflatoxin and other mycotoxin : an agricultural perspective. Report 80 56, (1979)
7. Diener, U. L., Peanuts-culture and uses., Am. Peanut Res. Educ. Assoc. (1973)
8. Cysewski, S. J., Pier, A. C., Engstrom, G. W. Richard, J. L., Keyl, A. C., and Booth, A. N., Aflatoxin effect on livestock. J. Am. Oil Soc. 48 : 599-604(1971)
9. Van Rensburg, S. J., Van Der Watt, J. J., Purchase, I. F. H., Coutin, L. and Markham, R., Primary cancer rate and aflatoxin intake in a high cancer area. S. Afr. Med. J. 48 : 2058 a-d (1974)

10. Rodricks, J. V., Hesseltin, C. W., and Mehman, M. A., Mycotoxin in human and animal health. Pathotox publ. Inc. (1977)
11. Wyllie, T. D. and Morehouse, L. G., Mycotoxin fungi, mycotoxin, mycotoxicoses, Bol. 3202, Marcel Dekker Inc. (1978)
12. Purchase, I. F. H., Mycotoxins in human health. Macmillian Press Ltd. (1971)
13. Bae, H. W., Korean Ginseng. Kor. Ginseing Res. Ins. 303, (1978)
14. Korean Pharmacopeial Convention, Korean Pharmacopeia. Korean Pharmacopeial Convention Inc. (1980)
15. Bahk, J. R. & Marth, E. H., Growth and synthesis of aflatoxin by *A. parasiticus* in the presence of gingeng products. J. Food Protec. 46 : (3) 210-215(1983)
16. Scott, P. M., and Kennedy, B. P. C., The analysis of spice and herbs for aflatoxins. Can. Inst. Food Sci. Technol. J, 8 : 124-125(1975)
17. Shibata, S., New natural products and plant drugs with pharmacological, biological or therapeutical activity. Wagner, H., Wolff, P., Springer-Verlag, 177-196g(1977)
18. Choi, J. H., Jang, J. G., Park, K. D., Park, M. H., and Oh, S. K., High performance liquid chromatographic determination of free sugars in gingeng and its products. Kor. J. Food. Sci. Technol. 13 : (2) (1981)
19. Sharma, A., Bahere, A. G., Padwal-Dessai, S. r., and Nad karrini, G. B., Influence of inoculum size of *A. parasiticus* spores on aflatoxin production. Appl. Environ. Microbiol. 40 : 989-993(1980)
20. Bennett, J. W., Dunn, J. J., and Goldman, C. L., Influence of white light on production of aflatoxin and anthraquinons in *A. parasiticus*. Apl. Environ. Microbil. 44 : 488-491 (1981)
21. Yousef, A. E., and Marth, E. H., Growth and synthesis of aflatoxin by *A. parasiticus* in the presence of sorbic acid. J. Food Prot. 44 : 736-742(1980)
22. Stubblefield, R. D., and Shotwell, O. L., Reverse phase analytical and preparative high pressure liquid chromatography of aflatoxin. J. A. O. A. C. 66 : 784-790(1977)
23. Yousef, A. E., and Marth, E. H., Kinetics of aflatoxin biosynthesis by *A. parasiticus* in the presence of Napalmitol-L-lysyl-L-lysine-ethyl ester dihydrochloride or dichlorovos. Biotechnol. Bioeng. 25 : 671-685(1983)
24. Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the of bacteriophage T4. Nature 277 : 680-685 (1970)