

SEMINARIO-TALLER CONTROL DE CALIDAD Y USOS DE LA SOYA INTEGRAL EN
ALIMENTACION ANIMAL

ASOCIACION AMERICANA DE SOYA
CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL - CIAT

Cali, Colombia, Junio 29-30 de 1995

MICOTOXINAS PRESENTES EN LA SOYA Y SUS SUBPRODUCTOS

Gonzalo J. Diaz G., DVM, MSc

Profesor de Toxicología

Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia

Universidad Nacional de Colombia

Introducción

El fríjol soya es una de las leguminosas mas importantes a nivel mundial en términos de producción y comercio. La semilla contiene un 20-23% de aceite y un 39-45% de proteína cruda, lo cual la hace una excelente fuente de energía y proteína para dietas animales.

Las micotoxinas son sustancias tóxicas resultantes del metabolismo secundario de ciertos géneros y especies de hongos, tanto de campo (hongos fitopatógenos) como de almacenamiento (hongos saprofiticos). Cuando estos hongos crecen en semillas de cereales o de oleaginosas pueden llegar a producir micotoxinas lo cual se constituye en un peligro potencial tanto para los humanos como para los animales que las consumen.

Las micotoxinas pueden producirse tanto a nivel de campo, durante el crecimiento de las plantas, como durante el almacenamiento de los granos. Muy poco se ha investigado con relación a la contaminación con micotoxinas en soya a nivel de campo. Bean *et al.* (1972) reportaron la presencia de aflatoxinas en 14 de 28 muestras de soya recién cosechada, las cuales se encontraban altamente contaminadas con hongos debido al exceso de lluvia que recibieron las plantas durante su crecimiento. Aparte de este único reporte de micotoxinas en soya recién cosechada, la mayoría de publicaciones sobre este tema se refieren a la presencia de micotoxinas en soya almacenada.

Hongos micotoxigénicos presentes en soya almacenada

Varios géneros y especies de hongos capaces de producir micotoxinas (micotoxigénicos) han sido reportados en frijol soya almacenado. Sin embargo, solamente tres micotoxinas han sido reportadas en soya contaminada de manera natural: aflatoxinas, ocratoxina A y T-2 toxina.

Mislivec y Bruce (1977) investigaron la identidad de las especies fúngicas presentes en la superficie de semillas de soya almacenada y encontraron que el hongo predominante era *Aspergillus flavus*. Otros hongos presentes en la soya incluyeron *A. candidus*, *Penicillium cyclopium*, *Alternaria spp.* y *Cladosporium spp.* Hongos del género *Phomopsis* también han sido reportados en soya.

En un estudio reciente, El-Kady y Youseff (1993) investigaron la identidad de los hongos filamentosos predominantes en 100 muestras de soya que habían estado almacenadas en condiciones comerciales durante 4 meses en Egipto. Los hongos micotoxigénicos que mostraron mayor incidencia fueron *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. alutaceus*, *P. chrysogenum* y *P. citrinum*.

Los diferentes géneros y especies de hongos micotoxigénicos reportados en soya y las micotoxinas potencialmente sintetizadas por estos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Hongos micotoxigénicos reportados en frijol soya

Hongo	Micotoxina producida	Reportada en soya
<i>Aspergillus spp.</i>		
<i>A. flavus</i>	Aflatoxinas	SI
	Acido ciclopiazónico	NO
<i>A. alutaceus</i>	Ocratoxina A	SI
<i>Penicillium spp.</i>		
<i>P. cyclopium</i>	Ocratoxina A	SI
<i>P. chrysogenum</i>	Acido ciclopiazónico	NO
<i>P. citrinum</i>	Citrinina	NO
<i>Alternaria spp.</i>	Fumonisinias	NO
<i>Phomopsis spp.</i>	Tricotocenos	Solamente T-2 toxina

Ocurrencia natural de micotoxinas en soya

En general, la incidencia de micotoxinas en soya es muy baja. En la gran mayoría de chequeos de incidencia de micotoxinas en los cuales se han incluido muestras de soya, los resultados han sido

negativos. Hasta el momento las únicas micotoxinas reportadas en soya contaminada de manera natural son las aflatoxinas, ocratoxina A y T-2 toxina. Los niveles de aflatoxinas detectados en soya han sido en general demasiado bajos como para constituir una amenaza para la salud y/o producción animal. Sin embargo, los niveles reportados de ocratoxina A y T-2 toxina son potencialmente tóxicos.

Aflatoxinas. Se considera que la soya es un sustrato pobre para la producción de aflatoxinas y los diversos muestreos que se han llevado a cabo en diferentes partes del mundo sustentan esta observación (Tabla 2). Shotwell *et al.* (1969) analizaron 866 muestras de soya correspondientes a las cosechas de soya de 1964 y 1965 en Estados Unidos y solamente 2 de ellas contenían niveles detectables de aflatoxinas, los cuales correspondieron a 7 y 10 µg/kg (ppb) respectivamente. En un estudio posterior, Shotwell *et al.* (1977) realizaron análisis de aflatoxinas, ocratoxina A y zearalenona en 180 muestras de soya de la cosecha de 1975 en los Estados Unidos y ninguna de las tres micotoxinas fue detectada.

Fernandez-Pinto *et al.* (1991) determinaron la presencia de aflatoxinas en 94 muestras de soya argentina producida durante las cosechas de 1986 y 1987. Nueve de las 94 muestras (9.6%) presentaron niveles detectables de aflatoxinas, los cuales variaron de trazas a 36 ppb. Estos resultados son muy similares a los observados por El-Kady y Youseff (1993), quienes analizaron en Egipto 100 muestras de soya para aflatoxinas, ocratoxina A, esterigmatocistina, T-2 toxina y zearalenona y únicamente detectaron aflatoxinas. El porcentaje de muestras positivas a aflatoxinas fue del 35% y los niveles variaron de 5 a 35 ppb.

Tabla 2. Ocurrencia natural de aflatoxinas en fríjol soya

País	Número de muestras			Rango (µg/kg)
	Analizadas	Positivas	%	
Estados Unidos	866	2	0.2	7-10
Argentina	94	9	9.6	trazas-36
Egipto	100	35	35	5-35

Ocratoxina A. Según estudios realizados en Inglaterra, las ocratoxinas parecen ser las micotoxinas más importantes de la soya y sus subproductos. Incidencias del 19-36% y niveles de 50 a 500 ppb de ocratoxina A han sido reportados en soya y subproductos de soya (Tabla 3). Niveles de 500 ppb (0.5 ppm) son potencialmente tóxicos para la mayoría de especies susceptibles a esta micotoxina tales como humanos, aves, cerdos, perros (Leeson *et al.*, 1995).

Tricotricenos. Los tricotricenos son un grupo de mas de 50 micotoxinas producidas principalmente por hongos del género *Fusarium*. Dentro de este grupo se encuentran la T-2 toxina, HT-2 toxina, T-2 tetraol, diacetoxiscirpenol (DAS), neosolaniol y deoxinivalenol (DON) entre otros (Leeson *et al.*, 1995).

Solamente se ha reportado la presencia de la T-2 toxina en soya. Esta micotoxina es una de las más tóxicas del grupo de los tricotricenos y son conocidos sus efectos toxicológicos en animales, caracterizados principalmente por necrosis dérmica y de mucosas, disminución en la ganancia de peso y consumo de alimento, disminución en la producción de huevos en aves de postura, etc. (Diaz *et al.*, 1994). Una investigación llevada a cabo en Carolina del Norte (Estados Unidos) de casos de sospecha de micotoxicosis en cerdos reveló que la torta de soya que estaban consumiendo los animales contenía T-2 toxina a niveles de 0.3-10 mg/kg (ppm); este hallazgo llevó a investigar la producción *in vitro* de micotoxinas de *Fusarium spp.* en soya y mostró que ésta es un excelente sustrato para la producción de zearalenona, T-2 toxina y HT-2 toxina, y en menor grado para la producción de T-2 tetraol y neosolaniol (Richardson *et al.*, 1985). Estos hallazgos se describen mas detalladamente en la siguiente sección.

Tabla 3. Ocurrencia natural de ocratoxina A en fríjol soya y productos de soya (Adaptado de "Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 1980")

Sustrato	Número de muestras			Rango (µg/kg) ppb
	Analizadas	Positivas	%	
Fríjol soya	25	9	36.0	50-500
Harina de soya	21	4	19.0	50-500
Productos de soya	28	6	21.4	50-500

La soya como sustrato para la producción de micotoxinas

En condiciones de laboratorio, soya inoculada con diferentes cepas micotoxigénicas de hongos ha desarrollado diferentes micotoxinas incluyendo aflatoxinas, ocratoxinas A y B, zearalenona, tricotricenos y fumonisinas. Sólo algunas de estas micotoxinas han sido detectadas en soya contaminada de manera natural, sin embargo, existe la posibilidad de que la no detección de otras micotoxinas en soya se deba simplemente a la falta de un mayor número de estudios de monitoreo de micotoxinas en este sustrato.

Aflatoxinas. Debido a que el hongo aflatoxigénico *A. flavus* es el hongo saprofítico predominante en la soya, varias investigaciones se han llevado a cabo para determinar el rol de la soya como sustrato

para la producción de aflatoxinas. En términos generales, la incidencia de aflatoxinas en soya es muy baja comparada con otros sustratos tales como arroz, maíz, maní, avena, trigo y sorgo (Shotweel *et al.*, 1978). No se sabe si esta bajísima incidencia de aflatoxinas en soya se deba a una inhibición en el crecimiento del hongo o a un efecto negativo sobre la síntesis de aflatoxinas, aunque algunas evidencias experimentales apuntan hacia la presencia de uno o mas componentes químicos inhibitorios de la síntesis de la toxina, no del crecimiento del hongo.

En condiciones *in vitro*, sin embargo, soya artificialmente inoculada con esporas de *A. parasiticus*, presenta condiciones favorables para el crecimiento del hongo. Farag *et al.* (1986) reportaron niveles comparables de aflatoxinas en soya y maní inoculado con esporas de este hongo (Tabla 4), mientras que Ehrlich y Ciegler (1985) reportaron niveles de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ de 2.4, 0.1, 3.7, y 0.1 ppm, respectivamente, en frijol soya inoculado con esporas de *A. parasiticus*. Un hallazgo interesante de estos estudios es la determinación de niveles mas altos de aflatoxina G₁ que de B₁ en soya, cuando en la mayoría de sustratos predomina la B₁. Este hallazgo a su vez tiene importantes implicaciones toxicológicas ya que la toxicidad de la aflatoxina G₁ es menor que la de la B₁ y demuestra cómo los métodos analíticos de cuantificación de "aflatoxinas totales" son cuestionables desde el punto de vista toxicológico.

Tabla 4. Producción de aflatoxinas por *A. parasiticus* inoculado en sustratos esterilizados y no esterilizados (Adaptado de Farag *et al.*, 1986).

Sustrato	Concentración de aflatoxinas (ppm)				
	B1	B2	G1	G2	Total
No esterilizado					
Maní	175	12	121	13	321
Soya	117	8	323	25	473
Esterilizado					
Maní	468	40	404	8	920
Soya	292	40	364	63	759

Tanto factores físicos como químicos han sido considerados como responsables de la baja incidencia de aflatoxinas en soya. Algunos de estos factores se discuten a continuación.

❖ Factores físicos importantes en la producción de aflatoxinas en soya

El factor más importante en la protección contra la colonización fúngica y producción de aflatoxinas en soya es la integridad de la semilla. Semillas dañadas (partidas o con quiebres en la cáscara) acumularon 60.4 ± 20.3 µg/g (ppm) de aflatoxinas luego de la inoculación con esporas de *A. flavus* mientras que las semillas intactas acumularon solamente 0.5 ± 0.2 ppm (Stössel, 1986). La cáscara del fríjol no solamente impide la colonización del cotiledón por parte del hongo sino que también asegura un bajo nivel de humedad al interior de la semilla.

Otro factor de vital importancia en la colonización fúngica es la humedad del grano. Se considera que a una humedad relativa del 70% y una temperatura ambiental de 20°C el nivel "seguro" de humedad del grano almacenado debe ser del 12%. Cuando la temperatura ambiental es de 30°C el nivel máximo de humedad debe ser del 11.5% (Williams, 1991). Cuando la humedad de la semilla sobrepasa los niveles anteriormente mencionados, se facilita la colonización y el crecimiento de hongos saprofitos y por ende la producción de micotoxinas.

❖ Inhibidores químicos de la producción de aflatoxinas

Los inhibidores de tripsina presentes en la soya no afectan el crecimiento de especies aflatoxigénicas de *A. flavus* ni la producción de aflatoxinas; tampoco la disponibilidad de zinc o la presencia de fitatos juegan un papel importante en la producción de aflatoxinas en soya (Ehrlich & Ciegler, 1985; Stössel, 1986). Sin embargo, cuando fríjol soya crudo fue extraído con hexano, algún compuesto inhibitorio fue removido ya que luego de inocular la soya con *A. parasiticus*, esta presentó niveles de contaminación con aflatoxinas B₁ y G₁ de 62 y 202 ppm, respectivamente, mientras que en la soya no extraída los niveles fueron de 3 y 4 ppm, respectivamente (Ehrlich y Ciegler, 1985). Este hallazgo puede ser muy importante desde el punto de vista industrial ya que implicaría que las tortas de soya extraídas con solventes presentan condiciones más favorables para la producción de aflatoxinas que las soyas integrales. El hecho de que la soya esterilizada constituya un sustrato más favorable para la producción de aflatoxinas que la no esterilizada (Tabla 4), ha dado lugar a diferentes conjeturas. El proceso de esterilización podría facilitar la producción de aflatoxinas debido a (1) rompimiento de la cutícula externa del grano, (2) destrucción de microorganismos que compiten con el hongo toxigénico, ó (3) destrucción de algún tipo de compuesto termosensible que impide la síntesis de las micotoxinas.

En estudios *in vitro*, Song y Karr (1993) demostraron que la fitoalexina de la soya conocida como **gliceolina** disminuye sustancialmente la producción de aflatoxina B₁ en cultivos de *A. flavus*, sin afectar el crecimiento del hongo. La gliceolina se produce cuando semillas viables de soya son infectadas con el hongo *A. flavus*. La síntesis de gliocelina en semillas infectadas explicaría de manera parcial el porqué la contaminación con aflatoxinas en soya es tan esporádica.

En otro experimento, Doehlert *et al.* (1993) investigaron el papel de la vía de la lipoxigenasa en la inhibición del crecimiento de *A. flavus* en soya. Las lipasas secretadas por el hongo en crecimiento

generan la producción de aldehídos volátiles por la vía de la lipoxigenasa y estos aldehídos, particularmente el hexanal, tienen conocida acción antifúngica. Por esta razón los autores concluyeron que la vía de la lipoxigenasa podría ser uno de los factores que contribuyen a la resistencia de la soya a la contaminación con aflatoxinas. Un hallazgo interesante de este estudio fue la observación de que los ácidos grasos linoléico y linolénico inhiben la germinación de esporas de *A. flavus*. Estos ácidos conforman alrededor del 55% del total de ácidos grasos presentes normalmente en la soya (Farag *et al.*, 1986). Los ácidos palmítico, esteárico y oléico no causaron ningún efecto sobre la germinación de esporas (Doehlert *et al.*, 1993).

Ocratoxinas y citrinina. Madhyastha *et al.* (1990) investigaron la influencia de diferentes sustratos en la producción de ocratoxinas A y B y citrinina por *Aspergillus alutaceus* y *Penicillium verrucosum* y encontraron que la soya constituye un excelente sustrato para la producción de ocratoxinas mas no para citrinina. Los resultados de este estudio se muestran en la Tabla 5. La alta producción de ocratoxinas *in vitro* en la soya, particularmente por el hongo *Aspergillus alutaceus*, ratifica lo observado en los estudios de contaminación natural con micotoxinas en soyas.

Tabla 5. Efectos de la especie de hongo y el sustrato en la producción de ocratoxina A (OA), ocratoxina B (OB) y citrinina por dos especies de hongos saprofiticos (Adaptado de Madhyastha *et al.*, 1990).

Especie y sustrato	OA (ppm)	OB (ppm)	Citrinina (ppm)
<i>Aspergillus alutaceus</i>			
Granos			
Maíz	74	0	0
Trigo	72	0	0
Oleaginosas			
Soya	243	389	0
Maní	342	132	0
<i>Penicillium verrucosum</i>			
Granos			
Maíz	21	0	126
Trigo	98	0	102
Oleaginosas			
Soya	7	0	0
Maní	18	0	0

Micotoxinas de *Fusarium* spp.: tricotricenos y zearalenona. Richardson *et al.* (1985) investigaron la habilidad de varias especies de *Fusarium*, productoras de zearalenona y tricotricenos, de producir estas micotoxinas en fríjol soya. El tamaño de partícula y la humedad del sustrato fueron variados para determinar los efectos de estas dos variables en la cantidad y tipo de toxina producida. La inoculación con *Fusarium roseum* 'Graminearum', produjo niveles altos de zearalenona en la soya. El hongo *Fusarium sporotrichioides*, conocido productor de T-2 toxina, produjo T-2 toxina, HT-2 toxina, T-2 tetraol y neosolaniol (Tabla 6). Los niveles de HT-2 toxina fueron mucho mayores que los de T-2 toxina, mientras que los de T-2 tetraol fueron muy bajos o no detectables. La producción de toxinas fue mucho mayor en semillas partidas y en torta de soya que en fríjol entero. Los autores concluyeron que la soya presenta un potencial peligro micotoxigénico en cuanto a micotoxinas producidas por *Fusarium* se refiere.

Tabla 6. Producción de micotoxinas de *Fusarium* (tricotricenos y zearalenona) en soya (Adaptado de Richardson *et al.*, 1985)

Sustrato	Humedad (%)	T-2 toxina (ppm)	HT-2 toxina (ppm)	T-2 tetraol (ppm)	Zearalenona (ppm)
Fríjol entero	33	32	49	0	219
	50	37	80	0	99
	60	17	109	0	106
Fríjol partido	33	71	111	27	90
	50	17	71	0	145
	60	15	46	0	201
Torta de soya	33	103	285	52	265
	50	110	284	0	271
	60	92	439	0	318

Fumonisinias. Las fumonisinias constituyen el grupo de micotoxinas mas recientemente descubierto. Conocidos efectos toxicológicos de las fumonisinias en animales lo constituyen las intoxicaciones conocidas como **leucoencefalomalacia de los equinos** y el **edema pulmonar de los porcinos**. Los efectos tóxicos de las fumonisinias en animales domésticos fueron recientemente revisados por Diaz y Boermans (1994). Las evidencias epidemiológicas que asocian el consumo de maíz contaminado con fumonisinias a una alta incidencia de cáncer esofágico en humanos han estimulado la investigación de la incidencia de estas micotoxinas en sustratos diferentes al maíz.

Holcomb et al. (1993) investigaron la habilidad del hongo *Fusarium moniliforme* de producir fumonisinas en diferentes sustratos. La soya resultó ser el peor sustrato y los niveles detectables de fumonisinas en ésta resultaron ser demasiado bajos como para considerar a la soya como un sustrato potencialmente peligroso en cuanto a contaminación con fumonisinas se refiere (Tabla 7). Por otra parte este estudio confirmó que la fumonisina es principalmente una micotoxina del maíz.

Tabla 7. Producción de fumonisina en diferentes sustratos inoculados con *Fusarium moniliforme* (Adaptado de Holcomb *et al.*, 1993).

Sustrato	Concentración de fumonisina (ppm)	
	Fumonisinina B1	Fumonisinina B2
Maíz	10,242	3,068
Arroz	206	100
Maní	5	<1
Soya	3	<1
Concentrado para roedores	34	50

Conclusiones

La soya parece ser un sustrato poco favorable para el crecimiento de hongos y/o la producción de micotoxinas. Sin embargo, pocos estudios de monitoreo de micotoxinas en soya han sido llevados a cabo por lo cual se requiere de mayor investigación en esta área para determinar la incidencia real de micotoxinas en esta importante materia prima.

Los estudios realizados hasta ahora han reportado unicamente tres micotoxinas contaminando soya en condiciones naturales. Estas micotoxinas son las aflatoxinas, la ocratoxina A y la T-2 toxina. Sin embargo, en ensayos *in vitro*, la soya constituye un sustrato apropiado para la síntesis de otras micotoxinas tales como la HT-2 toxina, T-2 tetraol, neosolaniol, zearalenona, e incluso fumonisinas.

Las evidencias experimentales indican que el fríjol soya integral, debido a que conserva su cutícula externa intacta y al hecho de que no se somete a extracciones con solventes orgánicos, es mucho menos propenso a la contaminación con aflatoxinas. Esto representa una ventaja en la utilización del fríjol soya integral con respecto a las tortas extraídas con solventes. El tamaño de partícula también influye en la colonización fúngica y producción de micotoxinas. El fríjol con su cutícula intacta presenta una barrera contra el hongo, mientras que esta barrera se pierde en la torta o harina de soya.

REFERENCIAS

- BEAN, G.A., SCHILLINGER, J.A. & KLARMAN, W.L. 1972. Occurrence of aflatoxins and aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* in soybeans. *Phytopathology*, 62:745-748.
- DIAZ, G.J. & H.J. BOERMANS. 1994. Fumonisin toxicosis in domestic animals. A Review. *Veterinary and Human Toxicology*, 36:548-555.
- DIAZ, G.J., E.J. SQUIRES, R.J. JULIAN & H.J. BOERMANS. 1994. Individual and combined effects of T-2 toxin and DAS in laying hens. *British Poultry Science*, 35:473-485.
- DOEHLERT, D.C., WICKLOW, D.T., GARDNER, H.W. 1993. Evidence implicating the lipoxygenase pathway in providing resistance to soybeans against *Aspergillus flavus*. *Phytopathology*, 83:1473-1477.
- EHRlich, K. & CIEGLER, A. 1985. Effect of phytate on aflatoxin formation by *Aspergillus parasiticus* grown on different grains. *Mycopathologia*, 92:3-6.
- FARAG, R.S., EL-LEITHY, M.A., BASYONY, A.E. & DAW, Z.Y. 1986. Effects of varied substrates on aflatoxin production by *A. parasiticus*. *JAOCs*, 63:1024-1026.
- LEESON, S., DIAZ, G.J. & SUMMERS, J.D. 1995. Poultry Metabolic Disorders and Mycotoxins. University Books, Guelph, Ontario, Canada.
- FERNANDEZ-PINTO, V.E., VAAMONDE, G., BRIZZIO, S.B. & APR0, N. 1991. Aflatoxin production in soybean varieties grown in Argentina. *Journal of Food Protection*, 54:542-545.
- HOLCOMB, M., SUTHERLAND, J.B., CHIARELLI, M.P., KORFMACHER, W.A., THOMPSON, H.C., LAY, J.O., HANKINS, L.J. & CERNIGLIA, C.E. 1993. HPLC and FAB mass spectrometry analysis of fumonisins B1 and B2 produced by *Fusarium moniliforme* on food substrates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41:357-360.
- MADHYASTHA, S.M., MARQUARDT, R.R., FROHLICH, A.A., PLATFORD, G. & ABRAMSON, D. 1990. Effects of different cereal and oilseed substrates on the growth and production of toxins by *Aspergillus alutaceus* and *Penicillium verrucosum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38:1506-1510.
- MINISTRY OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD. 1980. Surveys of mycotoxins in the United Kingdom. Food Surveillance Paper No. 4.
- MISLIVEC, P.B. & BRUCE, V.R. 1977. Incidence of toxic and other mold species and genera in soybeans. *Journal of Food Protection*, 40:309-312.
- RICHARDSON, K.E., HAGLER, W.M., HANEY, C.A. & HAMILTON, P.B. 1985. Zearalenone and trichothecene production in soybean by toxigenic *Fusarium*. *Journal of Food Protection*, 48:240-243, 245.
- SHOTWELL, O.L., HESSELTINE, C.W., BURMEISTER, H.R., KWOLEK, W.F., SHANNON, G.M., HALL, H.H. 1969. Survey of cereal grains and soybeans for the presence of aflatoxin. II. Corn and soybeans. *Cereal Chemistry*, 46:454-463.
- SHOTWELL, O.L., GOULDEN, M.L., BENNET, G.A., PLATTNER, R.D. & HESSELTINE, C.W. 1977. Survey of 1975 wheat and soybeans for aflatoxin, zearalenone, and ochratoxin. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 60:778-783.
- SONG, D.K. & KARR, A.L. 1993. Soybean phytoalexin, glyceollin, prevents accumulation of aflatoxin B₁ in cultures of *Aspergillus flavus*. *Journal of Chemical Ecology*, 19:1183-1194.
- STÖSSEL, P. 1986. Aflatoxin contamination in soybeans: role of protein inhibitors, zinc availability, and seed coat integrity. *Applied and Environmental Microbiology*, 52:68-72.
- WILLIAMS, P.C. 1991. The principles of grain handling and transportation, in: SMITH, J.E. & HENDERSON, R.S. (Eds) *Mycotoxins and Animal Foods*, CRC Press, Boca Raton, pp. 247-276.