大韓微生物學會誌：第12卷 第1號 1977
J. Kor. Soc. Microbiol., Vol. 12, No. 1, 1977

韓國 食品中의 有毒性 眞菌의 檢索 및 解毒에 關한 硏究

延世大學校 醫科大學 微生物學敎室

高春明・李逢起・金世鍾・柳 駿

=Abstract=

Studies on the Toxigenic Fungi and Detoxification Methods Isolated from Korean Foodstuffs

Choon-Myung Koh, Bong-Kee Lee, Se-Jong Kim and Joon Lew

Department of Microbiology, Yonsei University College of Medicine

These studies were carried out to detect the presence of mycotoxin fungi and detoxification of toxins in various kinds of grain and foodstuffs in Korea.

The experiments were divided into three parts: mycologic, toxicologic and electron microscopic study.

The results were summarized as follows:

1. From the 210 various samples (local grains, 150 samples; rice-cakes, 50 samples; meju, 10 samples), 1,205 colonies of fungi were isolated. In 1,127 of 1,205 colonies, it was possible to identify 21 genera. Among the identified strains, the predominant genera were *Aspergillus* sp. (28.5%), *Penicillium* sp. (27.1%) and *Mucor* sp. (7.8%).
2. In cytotoxicity test on HeLa cells, 25 strains showed severe toxic effects among the 240 strains of experiments.
3. In histopathologic test on mice, 21 strains showed severe toxic effect to mouse liver cells among the 240 tested strains.
4. In electron microscopic studies of HeLa cells and mouse liver cells from animal which had been treated with crude toxin, the liver cells showed the cytoplasmic change: dillatation or vacuolization of endoplasmic reticulum, swelling of mitochondria and disappearance of mitochondrial cristae, increased number of lipid and glycogen particles. Nucleus and nucelar envelope alterations were also noted.
5. In the detoxification study with ultraviolet irradiation, 90% of the toxic substances were denatured by the ultraviolet light irradiation for 24 hours.
6. As a mass screening, the cytotoxicity test of HeLa cells and histopathologic study of mice liver cells treated with culture filtrates, employed as feasible to detect mycotoxin producing fungi.

Ⅰ. 緒　　論

眞菌類가 各種 飮食物 특히 醱酵食品에 많이 利用되고 있는 사실은 널리 알려진 일이라 하겠으나 이들 眞菌中 數種의 代謝物質이 肝細胞에 有毒하며 나가서는 發癌性을 內包하고 있으며 그 이외에도 여러가지 形態의 毒性을 나타낸다고 報告된 以來 이는 世界的으로 國民保健 및 社會 經濟 等 여러 分野에 커다란 問題點으로 대두하기 시작하였으며 이와 같은 眞菌의 代謝物質, 卽 mycotoxin에 對한 硏究는 많이 進行되어 왔고 現在도 進行되고 있는 실정이다.

1961年 英國의 Sargeant 等에 依하여 칠면조의 X-disease의 原因이 *Aspergillus flavus*가 生産하는 독소 卽 mycotoxin의 一種인 aflatoxin에 依한 結果라고 하고 이는 發癌性을 內包하고 있다고 發表되었다. 이에 이와같은 硏究의 基礎實驗의 하나로서 여러 學者들에 依하여 여러가지 可檢物로부터 汚染되어 있는 眞菌類의 種類 및 독소分泌 可能菌株들의 分離가 試圖되었으며 더욱 各種 穀類 및 醱酵食品에서도 이의 分離可能性을 主張한 바 있다(Coomes 및 Sander, 1963; Lie 및 Marth, 1967; Scott, 1968; Brown 等, 1968; Kurata 等, 1968; Mayer, 1969; 柳等 1969; 高等, 1973).

한편 Austwick 및 Ayerst (1963), Asplin 및 Carnaghan (1961), Enomoto 및 Saito (1972) 等은 이들 mycotoxin 중 aflatoxin은 여러가지 實驗動物에 對하여 hepatoma를 일으키는 原因中의 하나라고 主張하고 그 以外의 여러가지 mycotoxin들도 역시 實驗動物 및 組織培養細胞에 對하여 여러 形態의 毒性을 일으킨다고 主張하였다.

Mycotoxin의 檢定方法으로서는 여러 學者들에 依하여 많은 方法이 使用되었는데 Kobayashi 等(1958), Uraguchi 等(1961), Salmon 및 Newberne (1963), Saito 等(1971) 그리고 高等(1973)은 數種의 實驗動物을 利用한 生體實驗으로서 Legator 및 Withrow(1964), Gablick 等(1965), Zuckuman (1968), Harley 等(1968), Harley 等(1969), Saito 等(1971), Ueno 等 (1970, 1973), 高等(1973), 趙等(1974, 1975)은 數種 組織培養細胞에 對한 有毒性 有無로서 toxin의 有無를 檢定하고 또한 物理化學的인 方法으로서 크로마토그라피方法을 利用하여 독소의 存在 및 種類를 確認하기도 하였다(Ashowth 및 McMeans, 1966; Broadbent 等, 1963; 朱等, 1971; 沈等, 1969; 高等, 1973, 1974, 1975; 柳等, 1969; 金等, 1977).

한편, mycotoxin의 解毒 및 除毒方法으로서는 여러가지 方法이 硏究되어 ① 物理的 機械的 方法 ② 化學的 方法 ③ 生物學的 方法等이 利用되었다. 卽 Culling device를 使用하여 汚染物質로부터 非汚染物質을 가려내는方法(Dollear 및 Gardner, 1966; Wogan, 1968)熱이나 化學物質(酸, 알카리, 鹽, 酸化, 還元劑, 가스 等)을 利用하는 方法(Mann 等, 1968; Coomes 等, 1966; Trager 및 Stoloff, 1967; 柳等, 1970; Robert 等, 1970)等이 硏究되었으며 生物學的方法으로서는 Ciegler 等(1966)은 여러 種類의 微生物을 利用하여 除毒作用을 硏究하였고 Davis 等(1966), Schoelder (1966), 高等(1975)은 독소分泌菌株와 非分泌菌株와의 混合培養, 菌絲體의 溶解現象(mycelial lysis)等을 利用하는 方法等도 可能한 方法中에 하나라고 主張하기도 하였다.

이에 著者等은 市販되고 있는 各 地方의 數種 穀類 및 食品類를 對象으로 汚染되어 있는 眞菌類를 分離同定하며 아울러 이들 菌株로 부터 有毒性 物質의 分泌 可能性의 有無를 生體實驗(In Vivo)과 實驗管內 試驗(In Vitro)을 通하여 觀察하며 아울러 이들 독소 分泌菌株에 對한 生物學的 및 物理的方法에 依한 除毒作用에 對한 一聯의 實驗을 實施하였던 바 그 結果를 얻을 수 있었기에 여기 報告하는 바이다.

Ⅱ. 實驗材料 및 方法

A. 實驗材料

1. 試料: 實驗에 使用한 試料로서는 各種 穀類 9種; 150例, 메주; 10例 및 數種의 떡; 50例로서 總 210例의 可檢物을 採取하여 實驗하였다.

2. 實驗에 使用된 培地 및 試藥: 本實驗에 使用된 培地로서는 美國 Difco會社 및 BBL會社의 製品을 主로 使用하였으며, 그 以外의 所要된 試藥은 市販되고 있는 一級試藥을 使用하였으며 市中에서 購入이 不可能한 것은 外國으로 부터 直接 輸入하여 使用하였다.

3. 實驗에 使用된 組織培養 細胞株 및 實驗動物: 實驗에 使用된 細胞株인 HeLa株는 國立保健硏究院에서 분양받아 本敎室에서 繼代 培養하고 있는 細胞株이었으며 實驗動物로 使用한 마우스는 日本國立癩病硏究院으로 부터 분양받은 ICR-마우스株이었다.

4. 標準菌株: 實驗의 對照群으로서 使用된 標準菌株로서는 本敎室에서 繼代保管中에 있는 數種의 菌株 卽 *Aspergillus flavus* ATCC 15517, *Aspergillus para-*

siticus RIB 1037; *Aspergillus toxicarium* RIB 4002, *Aspergillus versicolor* IFO 4105, *Penicillium citrinum* SWU 238, *Penicillium islandicum* IFO 5235, *Penicillium tardum* IFO 5787, *Penicillium brunneum* RIB 1172 및 *Fusarium nivale* Fn-2B의 各 1株씩이었다.

B. 實驗方法

1. 眞菌學的 實驗方法(Mycological Study)

(a) 眞菌의 分離方法 : 各種 可檢物에서 一定量을 採取하여 멸균증류수로서 3回以上 洗滌하여 表面에 汚染되어 있는 微生物을 除去한 뒤 1 liter 當 100mg의 Chloramphenicol 含有 Czapek-dox 固體培地 및 Peptone glucose 培地에 接種하여 25°C~27°C 培養器에서 培養하면서 매일 菌의 發育與否를 觀察함과 同時에 培養된 眞菌은 斜面培地에 옮겨 純粹培養을 實施하면서 이들 菌株를 使用하여 同定에 臨하였다.

(b) 分離 菌株의 同定方法 : 菌의 同定方法으로서는 肉眼的인 方法과 各種 培地上에 나타난 發育特性, 및 Slide 培養을 通한 微細構造의 特性을 調査하였으며 아울러 生理學的 檢査를 實施하므로서 菌을 同定하였다 (Raper 및 Thom, 1953; Raper 및 Fennell, 1965; Barnett, 1958; 村上等, 1962).

2. 毒物學的 實驗方法(Toxicological Study)

(a) 粗毒素(Crude-toxin)의 製造方法 :

① *Aspergillus* 및 *Penicillium*의 粗毒素 製造方法: 實驗菌株를을 Mycotoxin 生成用 培地* 200ml에 接種하여 25°C~27°C에서 一週間 靜置培養한 뒤 이를 여과하고 이 여과액의 3倍에 해당하는 量의 Chloroform을 첨가 3時間 진탕한 뒤 Chloroform 層을 分離 이 層으로 부터 추출한 배양여과액을 Crude-toxin으로 使用하였다.

② *Fusasium*의 粗毒素 製造方法 : *Fusarivm* sp·로 同定된 菌株들에 對하여서는 역시 mycotoxin 生成培地中 Fusarium 用 培地(Czapek dox media+1% peptone)를 使用하여 菌株를 接種하고 25°C~27°C 배양기에서 二週日間 靜置培養하였다.

培養후 여과지를 통하여 培養液을 여과한 뒤 1% (w/v)의 活性炭末과 混合, 冷所에서 가끔 흔들어 주면서 一晝夜를 處理한 뒤 다시 여과하여 얻은 炭末을 10培(v/w)의 methanol에 침적시켜 다시 一晝夜를 處理하고 이 methanol을 증발시킨 다음 다시 hot methanol로 再次 處理非溶解物質은 除去시킨다. 이 methanol 層에 5培(v/v)의 Chloroform을 첨가 침전물은 再次 除去한 후 용해된 Methanol-Chloroform 層으로 부터 얻은 배양여과 추출액을 crude-toxin으로 使用하였다.

(b) 毒素의 分析檢定方法(Toxin Assay Study)

① 薄層크로마토그라피方法(Thin-layer Chromatography) : 薄層크로마토그라피(以下 TLC로 略함) 方法으로서는 먼저 20×20cm 크기의 Chomato-plate上에 250μ 두께의 silica-gel G. (Merck 製)를 고르게 塗布한 뒤 110°C 乾燥器에서 2時間 activation(活性化)시킨 다음 배양액으로 부터 얻은 粗毒素 5μl를 spotting하였다. Spotting된 Chromato-plate를 展開用 溶媒인 Chloroform: acetone (9 : 1)로서 基線으로 부터 展開하였으며 展開후 螢光物質 檢出用 紫外線 燈(Ultraviolet Prod. Inc. 製, Long-wave 用 lamp: 波長 365mμ)

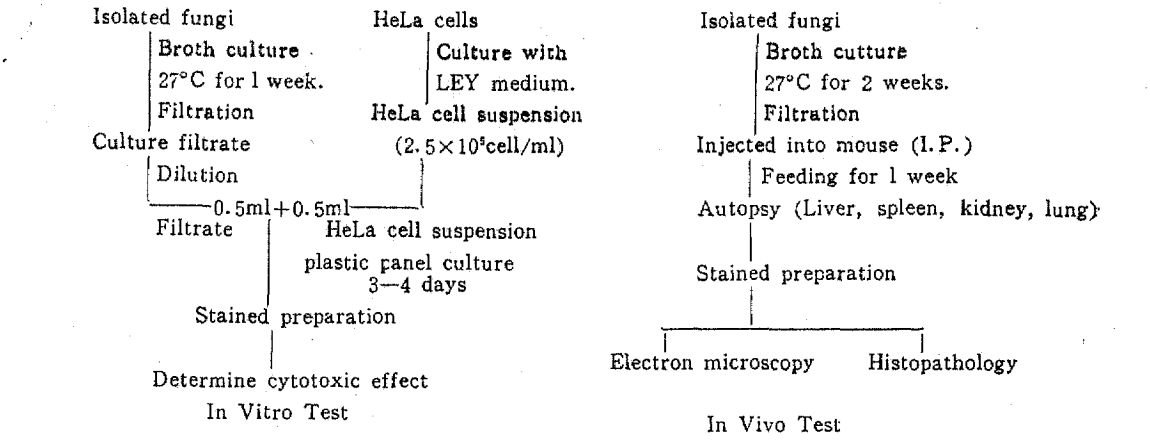

Fig. 1. Cytotoxic and Histopathologic Test in Vitro and in Vivo

을 使用하여 螢光性과 R_f-値를 標準物質과 比較하므로서 특신을 同定하였다.

② HeLa 細胞株에 對한 細胞毒性 實驗方法 : HeLa 細胞를 LEY-培地**에 10% 牛血淸 및 一定量의 抗生劑를 첨가하여 培養한 다음 이를 trypsin으로 37°C에서 20分間 處理하여 HeLa 細胞를 採取한 뒤 1ml當 2.5×10^5 cell되게 다시 培地로서 調整하고 이의 0.5ml와 各各 희석된 粗毒素를 混合하여 leighton culture tube에 注入, 37°C 배양기에서 3~4日間 培養하였다. 培養이 끝난 HeLa 細胞는 H—E 染色을 實施한 다음 Toplin (1959)法에 依하여 細胞毒性 程度를 測定하였다 (그림 1).

③ ICR—마우스株에 對한 毒性檢査 方法

ⓐ *Aspergillus* 및 *Penicillium*에 對한 實驗方法 : 먼저 生後 4週程度의 ICR—마우스株를 使用하여 배양여과액으로 만든 粗毒素를 마우스 20gm當 1.0ml의 基準으로 1~1.5ml를 腹腔內 注射하고 一週日後 도살하여 各種臟器(간장, 폐장, 신장, 비장)을 적출하여 一般的인 方法에 依한 病理組織 標本을 作成, 이들 各 臟器로 부터의 變化樣相을 관찰하였으며, 이를 利用하여 毒性 效果를 決定하였다(그림 1).

ⓑ *Fusarium*에 對한 實驗方法 : *Fusarium*으로 同定된 菌株에 對한 檢査方法으로서는 上記 方法에 의한 實驗以外에 *Fusarium*의 分泌毒素가 마우스의 皮膚組織의 壞疽를 일으키는 現象을 利用하여 粗毒素 0.2ml를 마우스 背面 皮下에 4日間 繼續 반복 주사하며 注射部位의 病變發生 有無를 調査함과 同時에 病理組織 標本을 作成하여 이를 觀察하므로서 毒性에 對한 實驗을 實施하였다.

④ 粗毒素로 處理한 ICR—마우스의 肝細胞 및 HeLa 細胞의 電子顯微鏡的 觀察方法 : 電子顯微鏡的 觀察을 위하여서는 上記 粗毒素로 處理한 마우스의 肝細胞 및 HeLa 細胞를 pH 7.4의 0.1 mol. phosphate buffered sol.으로 調整된 2% glutaraldehyde 溶液으로 先固定한 뒤 1% osmium tetoxide 溶液으로 2時間 後固定하였다 (Palade, 1952). 固定이 끝난 可檢物은 70% ethanol로 부터 上昇順으로 無水 ethanol 및 prophylene oxide로 脫水, Epon 812로 包埋한 뒤 (Luft, 1961), glass knife로서 Sorvall MT—2 Porterblum ultramicrotome을 使用하여 500Å의 두께로 切片을 作成, 飽和 uranyl acetate 및 lead citrate 溶液으로 二重染色한 다음, 日本 Hitachi製 HU—11, E—1型의 電子顯微鏡으로 觀察하였다.

(c) 毒素의 除毒에 關한 實驗方法

① 紫外線에 依한 實驗方法 : 배양여과액으로부터 얻은 粗毒素를 암실에서 紫外線燈(主波長 2700Å 波長範圍 2500Å~3500Å)을 30cm 높이에서 照射한 후 24時間 후의 毒素의 變化樣相을 調査하였으며 아울러 眞菌의 分裂子에 紫外線을 照射分裂子 表面의 變化를 觀察하였다.

② 混合培養에 依한 毒素分泌에 對한 實驗方法 : 二種以上의 菌株를 混合培養한 후 이의 배양여과액을 使用 粗毒素를 製造하고 이를 TLC 및 HeLa 細胞에 對한 毒性實驗을 實施하므로서 混合培養에 依한 毒素의 變化有無를 調査하였다.

* mycotoxin 生成用 培地

$NaNO_3$ 2.0gm, $FeSO_4$ 0.01gm, K_2HPO_4 1.0gm, $ZnSO_4$ 0.2gm, $MgSO_4$ 0.5gm, KCl 0.5gm, Sucrose 30.0gm, D. water 1,000ml, pH6.0~7.0

**LEY-medium for HeLa cultures

	1×LEY	2×LEY
10×Earle's salts	100ml	100ml
10×Lactbumin hydrolysate	100	100
10×Yeast extract	100	100
50×Sodium bicarbonate	10	20
Triple sterilized D. water	690	180

Ⅲ. 實驗成績

A. 眞菌의 分離成績

(1) 穀類에서의 分離成績

本實驗에 使用된 穀類는 市販되고 있는 것으로서 總 9種(쌀, 보리, 팥, 콩, 밀, 옥수수, 수수, 녹두 및 깨)이었으며 可檢物의 數는 150例이었다.

이들 중에서 分離된 眞菌의 數는 876株이었고 *Aspergillus* sp. 가 256株(29.3%)로서 首位를 차지하고 다음 *Penicillium* sp. 230株(26.4%), *Mucor* sp. 64株(7.4%)의 順序이었으며 未同定群은 57株(6.6%)이었다(第1表).

(2) 數種 떡에서의 分離成績

總 檢査物 50例에서의 成績을 보면, 8種(송편, 인절미, 시루떡, 찹쌀떡, 흰떡, 백설기, 약밥, 화전)의 可檢物로서 이중 20例의 떡에서는 眞菌의 分離가 불가능하였으며, 30例에서만 菌의 分離가 可能하였다. 이들 중 優位 菌株를 보면 역시 *Aspergillus* sp. 가 43株(31.2%)로서 首位였으며, 다음 *Penicillium* sp. 40株(29.0%), *Rhizopus* sp. 15株(10.8%)의 順序이었고

Table 1. Number of fungi and frequency of occurrence isolated from various grains

Fungi isolated	no. of isolates	%
Aspergillus	256	29.3
Penicillium	230	26.4
Mucor	64	7.4
Aliernaria	63	7.3
Rhiyopus	44	5.1
Cladosporium	39	4.6
Fusarium	33	3.8
Neurospora	18	2.1
Phoma	12	1.4
Scopulariopsis	8	0.9
Helminthosporium	7	0.8
Trichoderma	7	0.8
Cephalosporum	6	0.6
Tyncephalostrum	5	0.5
Fusidium	6	0.6
Oedocepalum	2	0.2
Haplosporangium	2	0.2
Nigraspora	2	0.2
Sepedonium	2	0.2
Absidia	2	0.2
Yeast-like organisms	7	0.8
Unidentified	57	6.6
Total	376	100.0

Table 2. Number of fungi and frequency of occurrence isolated from rice cakes

Fungi isolated	No. of isolates	%
Aspergillus	43	31.2
Pencillium	40	29.0
Rhiyopus	15	10.8
Mucor	12	8.7
Neurospora	6	4.3
Alternaria	3	2.2
Absidia	2	1.4
Cladosporium	2	1.4
Yeast-like organisms	7	5.0
Unidentified	8	6.0
Total	138	100.0

Table 3. Number of fungi and frequency of occurrence isolated from meju

Fungi isolated	No. of isolates	%
Penicillium	57	24.2
Aspergillus	45	23.3
Cladosporium	23	11.9
Alternaria	20	10.4
Mucor	18	9.3
Rhizopus	13	6.7
Scopulariopsis	7	3.4
Fusarium	7	3.4
Helminthosporium	3	1.5
Yeast-like organisms	10	5.1
Unidentified	13	6.7
Total	193	100.0

未同定群이 8株(6.0%)이었으며 分離 總數는 138株이었다(第2表).

(3) 메주에서의 分離成績

메주 10例에 對한 菌分離 成績을 보면 分離된 總 眞菌數는 193株이었으며 이는 10屬으로 分類가 可能하였다. 分類可能한 菌株中 *Penicillium* sp.가 57株(24.2%)로서 首位를 차지하였고, 다음 *Aspergillus* sp. 45株(23.3%), *Cladosporium* sp. 23株(11.9%)의 順序이었고 13株(6.7%)는 同定이 不可能하였다(第3表).

B. 毒素의 分析檢定 成績

(1) 薄層크로마토그라피의 成績

ⓐ 標準菌株에 對한 成績 : 本實驗에 使用된 菌株를

Table 4. Thin layer chromatographic R_f-value of reference strains

Generic name	R_f-value
Aspergillus flavus ATCC 1517	0.41 0.49 0.57 0.69
Asp. parasiticus RIB 1037	0.28 0.50 0.55 0.68
Asp. toxicarium RIB 4002	0.48
Asp. versicolor IFO 4105	0.32 0.50 0.57
Penicillium citrinum SWU 238	0.41 0.48 0.58
Pen. islandicum IFO 5235	0.14 0.50 0.96
Pen. tardum IFO 5787	0.21
Pen. brunneum RIB 1172	0.14 0.38 0.50
Fusarium nivale Fn-2B	0.88

Table 5. Results of TLC R_f-value and toxicity test on the HeLa cells and mice in the isolated strains (*Aspergillus* sp.)

Name of strains	R_f-value	Grade of toxicity on HeLa cell	Grade of toxicity on mice
Aspergillus A-2	0.57 0.69	2+	2+
A-8	0.55 0.68	2+	2+
A-22	0.15	−	1+
A-30	0.16	−	1+
A-31	0.20	−	1+
A-35	0.50 0.68	2+	1+
A-36	0.16	−	1+
A-45	0.15	−	1+
A-49	0.56	1+	1+
A-66	0.56 0.68	1+	2+
A-78	0.55	1+	−
A-82	0.68	1+	1+
A-89	0.55 0.68	2+	2+
A-90	0.16	1+	−
A-93	0.15	1+	−
A-98	0.56	1+	1+
N_1-2	0.55	1+	1+
N_1-7	0.20	1+	−
N_1-25-1	0.69	1+	1+
N_1-25-2	0.57 0.68	2+	1+
N_1-25-5	0.56 0.68	2+	2+

의 薄層크로마토그라피의 成績을 보면, *A. flavus* ATCC 15517, *A. parasiticus* RIB 1037株는 4個의 spot를 *A. versicolor* IFO 4105, *P. citrinum* SWU 238, *P. islandicum* IFO 5235, *P. brunneum* RIB 1172株는 3個의 spot 그리고 *A. toxicarium* RIB 4002, *P. tardum* IFO 5787 및 *F. nivale* Fn—2B株는 各各 1個의 spot를 나타내었으며 이들 중 *A. flavus* ATCC 15517, *A. parasiticus* RIB 1037, *P. citrinum* SWU 238 等은 螢光性 및 R_f—値를 보면 aflatoxin, *F. nivale* Fn—2B株는 fusarenon-X와 一致하는 樣相을 나타내었다(第4表).

ⓑ 實驗菌株에 對한 實驗成績

① *Aspergillus* sp.에 對한 實驗成績 : *Aspergillus* sp.의 分離菌株 總 344株中 本 實驗에 使用된 菌株는 100株이었으며 이중 13株가 TLC上에서 Rf—値가 0.5 부근의 greenish spot 및 0.6~0.7 부근의 bluish spot를 나타내었으며 4個의 spot를 나타내는 菌株는 發見할 수 없었고 7株가 2個의 spot를, 6株가 1個의 spot를 나타내고 있었다(第5表).

② *Penicillium* sp. 에 對한 實驗成績 : *Penicillium* sp.에 對한 對驗成績을 보면 總 分離菌株 327株中 100株에 對하여 實驗을 實施하였으며, 44株가 1~3個의 spot를 形成하였으며 이 중 對照群中 Mycotoxin 分泌可能菌株의 R_f—값과 一致하는 菌株는 23株이었으며 나머지 21株는 差異點이 있었다. 또한 R_f—값이 一致하는 菌株라 하더라도 모두 標準菌株와 一致하는 것이 아니고 1~2個의 spot가 一致하였다(第6表).

③ *Fusarium* sp.에 對한 實驗成績 : *Fusarium* sp.의 總 分離菌株 數는 40株이었으며, 이에 對한 TLC의 成績을 보면 40株中 19株가 1個의 spot를 나타내고 있었으며 이중 5株의 R_f—값이 標準菌株인 *F. nivale* Fn-2B가 나타내는 R_f—값(0.88)과 同一한 R_f—값을 나타내고 있었고 炭末處理여과액이나 methanol eluted fraction 역시 별다른 差異를 나타내지 않았다. 이 R_f

Table 6-1. Results of TLC R_f-value and toxicity test on the HeLa cells and mice in the isolated strains (*Penicillium* sp.)

Name of strains	R_f-value	Grade of toxicity on HeLa cell	Grade of toxicity on mice
Penicillium P-2	0.21	1+	−
P-4	0.32	1+	1+
P-11	0.41 0.50 0.57	2+	2+
P-21	0.48	1+	1+
P-31	0.21	−	1+
P-31	0.50 0.57	2+	1+
P-33	0.40 0.49 0.58	2+	2+
P-35	0.40 0.50	2+	2+
P-36	0.42 0.51 0.58	2+	2+
P-39	0.57 0.70	1+	2+
P-44	0.57 0.69	2+	−
P-47	0.40 0.57 0.69	2+	3+
P-49	0.11	1+	−
P-50	0.49 0.47 0.69	2+	2+
P-54	0.19	1+	−
P-56	0.49 0.56	1+	1+
P-61	0.50 0.68	2+	−
P-63	0.41 0.57 0.69	1+	3+
P-66	0.20	−	1+
P-67	0.14	1+	1+
P-69	0.15	1+	−
P-75	0.57 0.69	1+	1+
P-88	0.41 0.50	1+	−
P-92	0.15	−	1+
P-94	0.15	−	1+
P-96	0.12	1+	−
N_2-1	0.10	1+	−
N_1-2	0.40 0.50	1+	2+
N_1-3	0.15	1+	−
N_1-4	0.18	−	1+
N_1-7	0.12	−	1+
N_1-8	0.41 0.67	2+	1+
N_1-9	0.55	2+	1+
N_1-9	0.55	2+	1+
N_1-10	0.15	1+	−
N_1-11	0.13	1+	−
N_1-12	0.17	1+	−
N_1-14	0.50 0.55	2+	2+
N-19	0.57	1+	2+

Table 6-2. Results of TL R_f-value and toxicity test on the HeLa cells and mice in the isolated strains (*Penicillium* sp.)-Continued.

Name of strains	R_f-value	Grade of toxicity on Hela cell	Grade of toxicity on mice
Penicillium N_1-25	0.49 0.68	2+	−
N_1-25-3	0.50	1+	2+
N_1-27	0.67	1+	1+
RC-8	0.17	−	1+
RC-10	0.55	1+	1+
RC-11	0.55	1+	1+

Table 7. Results of TLC R_f-value and toxicity test on the HeLa cells and mice in the isolated strais (*Fusarium* sp.)

Name of strains	R_f-value	Grade of toxicity on HeLa cell	Grade of toxicity on mice
Fusarium F-1	0.87	1+	2+
F-8	0.88	2+	1+
F-11	0.88	1+	2+
F-25	0.80	1+	1+
F-30	0.88	1+	2+
F-34	0.80	−	−
F-37	0.72	−	−
F-45	0.75	−	1+
F-80	0.87	1+	1+
F-83	0.88	2+	2+
N_2-7	0.85	−	1+
RC-2	0.87	2+	1+
RC-11	0.88	2+	2+
N-7	0.85	1+	−
N_1-15	0.86	2+	1+
N_1-19	0.87	2+	1+
N_1-20	0.87	2+	1+
N-20	0.86	1+	−
N-25	0.86	1+	1+

값 0.88은 fusarenon-X의 TLC上에서의 R_f—값과 同一한 數値이었다(第7表).

(2) HeLa 細胞株에 對한 實驗成績

ⓐ **標準菌株에 對한 實驗成績**：標準菌株들의 HeLa 細胞株에 對한 細胞毒性實驗成績을 보면 *P. brunneum* RIB 1172株 및 P. *tardum* IFO 5787株를 제외하고는 모두 細胞毒性 2+以上의 程度를 나타내고 있음을 觀察할수 있었으며, 上記 두 種類의 標準菌株는 細胞毒性現象을 나타내지 않았다(第8表).

ⓑ **實驗菌株에 對한 實驗成績**

① *Aspergillus* sp.에 對한 實驗成績：實驗菌株 100株中 中等度以上(2+)의 細胞毒性을 나타내는 菌株는 6株이었으며, 10株는 細胞毒性 1+程度의 낮은 毒性을 나타내고 있었다. 이와 TLC의 結果를 比較 觀察하여 보면 TLC上의 標準菌株의 R_f—값과 一致하는 菌株가 13株인 반면, HeLa細胞株에서는 16株이었으며 양측 共히 一致하는 菌株가 大部分이었다(第5表).

② *Penicillium* sp.에 對한 實驗成績：總 100株中에

Table 8. Results of toxicity test on HeLa cells and mice in the reference strains

Generic name	Grade of toxicity on HeLa cell	Grade of toxicity on mice
Aspergillus flavus ATCC 15517	2+	2+
Asp. parasiticus RIB 1037	3+	3+
Asp. toxicarium RIB 4002	2+	1+
Asp. versicolor IFO 4105	2+	2+
Penicillium citrinum SWU 238	2+	1+
Pen. islandicum IFO 5235	2+	1+
Pen. tardum IFO 5787	0	0
Pen. brunneum RIB 1172	0	0
Fusarium nivale Fn-2B	3+	3+
Test Control	0	0
Control	0	0

서 細胞毒性이 2+以上이 되는 菌株는 13株이었으며 細胞毒性이 1+의 菌株가 25株로서 總 毒性을 나타낸 菌株는 38株이었다(第6表).

③ *Fusarium* sp.에 對한 實驗成績 : *Fusarium* sp.에 對한 實驗成績을 보면 總 40株中 세포독성 2+以上을 나타낸 菌株는 7株이었으며, 細胞毒性 1+以上을 나타낸 菌株는 8株로서, 總 HeLa 細胞株에 대한 細胞毒性을 나타낸 菌株는 15株이었다(第7表).

(3) ICR-마우스株에 對한 實驗成績

ⓐ 標準菌株에 對한 實驗成績 : 標準菌株에 對한 實驗成績을 보면, *A. parasiticus* RIB 1037과 *F. nivale* Fn-2B 株는 重症, *A. flavus* ATCC 15517, *A. versicolor* IFO 4105 및 *P. citrinum* SWU 238, *P. islandicum* IFO 5235株는 輕症의 變化를 야기하였으며 *P. tardum* IFO 5787 및 *P.* brunneum RIB 1172 株는 별다른 病變을 일으키지 않았다(第8表).

ⓑ 實驗菌株에 對한 實驗成績

① *Aspergillus* sp.에 對한 實驗成績 : 實驗菌株中 마우스에 對하여 毒性을 일으키는 菌株는 總 17株이었으며, 이중 中等度以上의 毒性을 야기하는 菌株는 5株이었고 나머지 12株는 輕度의 毒性을 나타내었다(第5表).

② *Penicillium* sp.에 對한 實驗成績 : 總 實驗菌株中에서 마우스에 對하여 毒性을 야기하는 菌株는 30株이었으며, 이중 12株가 中等度以上의 毒性을 나타내었고 나머지 18株는 輕度의 毒性을 나타내었음을 觀察할 수 있었다(第6表).

③ *Fusarium* sp.에 對한 實驗成績 : *Fusarium* sp.에 對한 實驗成績을 보면, 總 40株中 中等度以上의 毒性을 나타낸 菌株는 5株이었고, 10株는 輕度의 毒性을 나타내어 總 15株가 ICR—마우스에 對하여 毒性을 나타내었다(第7表).

한편, 皮膚內에 粗毒素를 注入하여 皮膚의 壞疽發生與否를 觀察한 結果를 보면, 實驗菌株 總 40株中 12株가 마우스 背面 皮膚에 壞疽現象을 일으키는 것을 觀察할 수 있었다.

(4) 電子顯微鏡的 觀察成績

ⓐ HeLa 細胞株에 對한 成績 : 正常 HeLa 細胞의 微細構造를 보면, 核膜에 둘려싸여 있는 둥근 모양의 核과 核物質內의 仁이 存在하고 있다. 많은 數의 cristae가 잘 發達된 mitochondria가 있으며, 그 외에 golgi apparatus, ER-system, vacuole, lipid 및 glycogen droplet등 正常的인 細胞構造를 가지고 있었다(사진 5).

독시로서 處理된 細胞는 HeLa 形態的인 變化를 가져와 核의 모양이 不規則하게 되어 있으며 아울러 仁이 核膜에 부착되어 있는 모양이 관찰되었다. 또한 golgi apparatus의 消失, ER-system의 종창 내지 액포화 現象이 나타나며 vacuole의 증가현상이 나타났다. 그러나 이는 實驗菌株들의 差에 依하여 差異를 나타내고 있음을 관찰할 수 있었다(사진 6).

ⓑ ICR—마우스의 肝細胞에 對한 實驗成績 : 正常마우스의 肝細胞의 微細構造를 보면, 원형의 核과 核膜 주위에 電子密度가 높은 chromatin 및 核小體를 볼 수 있으며 粗面小胞體는 差異는 있으나 여러 形態를 볼수

Table 9. Results of TLC R_f-value and toxicity test on the HeLa cells and mice in ultraviolet ray irradiated reference strain

Generic name	R_f-value	Grade of toxicity on HeLa cells	Grade of toxicity on mice
Standard *Aspergillus flavus* ATCC 15517	0.41 0.49 0.57 0.69	2+	2+
U-V ray irradiated *Aspergillus flavus* ATCC 15517	0.10 0.40 0.90	−	−

Table 10. Results of TLC R_f-value and toyicity test on the HeLa cells and mice in mixed cultures of reference strains

Generic name	R_f-value	Grade of toxicity on HeLa cell	Grade of toxicity on mice
Asp. flavus ATCC 15517 + *Asp. parasiticus* RIB 1037	0.41 0.50 0.59 0.69	3+	3+
Asp. flavus ATCC 15517 + *Asp. citrinum* SWU 238	0.40 0.51	2+	2+
Asp. parasiticus RIB 1037 + *Pen. tardum* IFO 5787 + *Pen. brunneum* RIB 1172	0.14 0.21 0.30 0.80 0.92	−	−

있고 원형 혹은 장방형의 mitochondria, golgi apparatus, glycogen, lipid droplet, microbody, lysosome, microbilli 및 multiple vesicle 등이 관찰되어 正常的인 마우스의 肝細胞의 微細構造이었다(사진 7).

그러나 독신으로 處理된 마우스의 肝細胞의 微細構造를 보면, mitochondria 의 swelling, 粗面小胞體의 중창 내지 액포화, mitochondria 의 cristae 소실, 核의 팽대 및 核小體의 capping 현상과 아울러 lipid, glycogen droplet 의 증가현상을 관찰할 수 있었으나 이는 菌株에 따라 많은 差異點을 나타내고 있었다(사진 8).

(5) 독신의 除毒作用에 對한 實驗成績

ⓐ **紫外線 照射에 對한 實驗成績** : 독신을 24時間 동안 紫外線으로 處理한 뒤의 成績을 보면, 90% 以上의 독신이 파괴 변화를 일으켰으며, TLC 上에서의 結果도 色調 및 R_f—값의 變化를 招來하여 標準物質과는 다른 結果를 나타내었다(第 9 表).

ⓑ **混合培養에 依한 實驗成績** : 標準菌株로서 *A. flavus* ATCC 15517 및 *A. parasiticus* RIB 1037株를 混合培養한 경우는 4個의 spot를 나타내었고 *A. flavus* ATCC 15517 및 *P. citrinum* SWU 238株를 混合培養한 結果는 2個의 spot를 보였는데 이는 TLC 上에서의 色調 및 R_f—값이 aflatoxin 의 TLC 上에서의 色調와 R_f—값과 一致하는 것이었다. 그러나 *A. parasiticus* RIB 1037과 *P. tardum* IFO 5787 및 *P. brunneum* RIB 1172株와 混合培養하였을 경우에는 5個의 spot 를 관찰할 수 있었으나 이의 TLC 上에서 色調 및 R_f—값은 標準物質인 aflatoxin 과의 諸 特性이 서로 差異를 나타내고 있었다(第10表) .

또한, 實驗菌株中 毒性을 나타내는 菌株와 아무런 毒性을 나타내지 않는 菌株를 混合培養하였을 경우 菌株의 差異에 따라 TLC 上에서 標準物質의 諸 特性을 그대로 나타내는 菌株들도 있었고 때로는 變化된 樣相을 나타내기도 하였으나 많은 實驗例에서 毒性을 나타내지 않는 菌株와 混合培養하였을 경우에는 變化된 樣相을 나타내는 경우가 많았다.

Ⅳ. 考 按

眞菌의 代謝物質中 數種이 人體 또는 動物들에 대하여 有毒하며 더욱 發癌性을 內包하고 있다고 報告된

以來 여러 學者들에 依하여 이에 對한 많은 硏究가 實施되었으며 Enomoto 및 Saito (1972)는 이들 毒素中 7種은 實驗的으로 癌을 發生시킨다고 發表하고 이는 特히 肝에 對하여 有毒하다고 主張하였다.

現在까지 世界的으로 이들 有毒性 物質을 分泌하는 眞菌類는 여러 곳에서 여러가지 可檢物로 부터 分離가 可能하다고 알려져 있으며 이중 各種 穀類 및 食品에서의 分離成績을 보면 이들로 부터의 分離 優位菌株들은 다소의 差異는 있다고 보겠으나 大部分이 *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp., *Rhizopus* sp., 및 *Mucor* sp., 等을 들 수 있으며 學者間에 差異는 있으나 보통 15~22屬의 菌株分離가 可能하다고 發表하였다(Kurata 等, 1968; Uraguchi, 1961; Christensen 等, 1954, 1957, 1960, 1965; Wallace 및 Sinha, 1962; Garren, 1966; 高 및 柳, 1970; 高等, 1972, 1975). 이와 같은 他硏究者들의 結果와 本實驗의 結果를 比較하여 볼 때 本 實驗 結果에서도 穀類 20屬, 떡 9屬, 메주 10屬의 菌株를 分類할 수 있었던 點으로 보아 他實驗과 一致하는 結果라 하겠다.

Toxin의 分析方法으로서 使用되는 方法中 하나인 TLC에 依한 檢出은 現在까지 여러 學者들에 依하여 수행되어 이 方法에 依한 독신의 檢出方法 역시 좋은 方法中의 하나라고 主張하였으며(Goldblatt, 1970; Wright, 1968; 高等, 1973) aflatoxin의 경우 B_1 및 B_2는 blue fluorescence를 G_1 및 G_2는 green fluorescence를 나타내고 이들을 elution한 경우 99%의 순수결정을 얻을 수 있다고 發表하였다. 本 實驗結果에서 *Aspergillus* sp. 및 *Penicrllium* sp.의 實驗菌株의 TLC 結果를 보면 32株가 blue 및 green fluorescence를 나타내고 있으며 R_f—값 역시 aflatoxin의 R_f—값과 유사하고 아울러 이들중에서 HeLa 細胞株 및 마우스 肝細胞에 毒性을 야기하였다는 點등은 實驗菌株 중에 독신分泌 可能菌株가 內包되어 있다는 것을 나타낸 결과라 하겠으며 이는 李等(1971), 鄭 및 權(1973), 李等(1970), 高等(1973), 金等(1977)의 實驗結果 aflatoxin 및 aflatoxin樣 物質을 檢出할 수 있었다는 他硏究結果와 一致하는 結果라 하겠다.

또한, 組織細胞를 利用한 독신의 分析檢査方法으로서는 Svoboda 等(1966)은 원숭이의 肝細胞로서 Legator 및 Withrow (1964), Saito 等(1971), 趙等(1973), 高等(1974, 1975)은 HeLa 細胞, Zuckesman (1968)은 태아기의 肝細胞, Ueno 等(1973)은 家兎의 組織等을 利用하여 독신의 分泌 여부를 screening하는 實驗을 通하여 독신 分泌 여부의 screening이 可能하였다고 主張하였는데 本 實驗結果 역시 分離菌株와 標準菌株를 比較하여 볼때 HeLa 細胞를 利用한 독신의 screening은 可能한 것으로 思料되며 이는 他 硏究 結果와 一致하는 것이라 하겠다.

마우스를 利用한 實驗 結果 역시 여러 實驗動物을 使用하여 많은 學者들이 病理組織學的 硏究를 通한 感受性 檢査 및 病理學的 實驗을 實施하여 組織細胞의 病變 및 나가서는 惡性 腫瘍으로의 移行等을 硏究하였다. Madhaven (1965)는 원숭이에게 aflatoxin을 투여 肝細胞의 지방변성과 담관증식, Cuthberton (1967)은 간경변 및 거대세포의 출현, periportal necrosis, Butler (1965)는 parenchymal cell의 degeneration, liver tumor 等을 관찰하였다고 주장하였으며 Uraguchi (1973), 趙等(1973), 高等(1974, 1975)는 마우스를 使用하여 肝細胞의의 focal necrosis, parenchymal cell의 inflammation 等을 나타낸다고 하였는데 本 實驗에서도 역시 肝細胞의 focal necrosis, 및 parenchymal cell의 inflammatory change를 나타낸 점은 他 科究者와 同一한 結果를 나타낸 것이며 독신 分泌 여부의 screening 方法으로서는 TLC 方法과 아울러 HeLa 細胞에 對한 毒性實驗과 함께 마우스에 對한 實驗을 實施할 경우 좋은 結果를 얻을 수 있을 것으로 思料된다.

Aflatoxin의 除毒作用에 對한 實驗結果를 보면 柳等(1969)은 U-V 線의 照射에 依하여 15時間 處理 結果, 90%의 독신파괴현상을 관찰할 수 있었다고 하고 高等(1975)은 非독신分泌菌株와 독신分泌菌株와 混合培養時 독신 特性의 變化를 가져온다고 主張한 點 등과 本 實驗結果 紫外線으로 24時間 處理後의 TLC 結果가 處理前과 差異를 나타낸 結果 및 菌株混合培養結果 TLC 上에서의 色調와 R_f—값의 變化等을 招來한 點等은 上記 硏究 結果와 一致하는 點들이라 하겠으나, 이는 모든 菌株에서 같은 樣相을 나타내고 있지 않아 이는 좀 더 세밀한 硏究가 이루어져야 할 것으로 思料된다.

電子顯微鏡的 所見을 通한 마우스 肝細胞의 微細構造 및 HeLa 細胞를 보면, 독신으로 處理된 HeLa 細胞의 경우, 不規則한 형태의 核과 golgi apparatus의 消失, 粗面小胞體의 종창 내지 액포화와 毒性이 강한 경우 細胞의 內容物質을 거의 관찰할 수 없었다. 또한 肝細胞의 變化는 核의 變化, 核小體의 capping 粗面小細胞體의 종창 및 액포화, mitochondria의 종창 및 cristae의 소실등의 變化를 나타낸다고 主張하였는데 (Svoboda, 1966; 金, 1971; 滕等, 1974; 高等 1974, 1975) 本 實驗結果에서도 同一한 樣相을 招來하였다.

以上의 實驗을 綜合하여 보았을 경우, 우리나라에서 生産되고 있는 各種 穀類 및 저장곡류, 식품, 발효식품등에는 mycotoxin 分泌 可能菌株의 汚染의 可能性을 內包하고 있다고 생각되어 좀 더 이에 대한 體系的이고 組織的인 硏究가 계속 이루어 져야 할 것으로 思料되며 마우스 및 HeLa 細胞를 利用한 mycotoxin의 screening 方法은 좋은 方法으로 생각되나 우리나라의 형편에서 볼때 좀더 간편하고 빠른 方法이 開發되어야 할 것으로 생각되며 아울러 복신의 解毒 및 除毒方法에 對한 연구로서는 우리나라의 국민 主食이 穀類이며 여러가지의 醱酵食品을 많이 섭취하는 點 등을 考慮하여 앞으로 좀더 계속적인 많은 多角度의 硏究가 實施되어야 할 줄로 믿는다.

V. 結　論

各 地域으로 부터 수집한 穀類 9種 130例, 떠 8種 50例 및 메주 10例 總 210例를 對象으로 하여 mycotoxin의 分泌可能菌株의 分離同定 및 HeLa 細胞, 마우스를 利用한 細胞毒性을 實驗함과 同時에 除毒方法에 對한 一聯의 實驗과 結果를 要約하면 다음과 같다.

1. 수집된 可檢物 總 210例로부터 1,205株의 菌株를 分離할 수 있었으며 이중 同定이 可能하였던 屬은 總 22屬으로 1127株이었으며, 이 가운데 *Aspergillus* sp. 344株(285%)로서 首位를 차지하였고 다음 *Penicillium* sp. 327株(27.1%), *Mucor* sp. 94株(7.8%) *Alternaria* sp. 86株(7.1%)의 順位이었다.

2. HeLa 細胞株에 對한 毒性實驗結果는 實驗菌株 총 240株中 中等度 以上의 毒性을 나타내는 菌株가 25株이었다.

3. 마우스의 毒性實驗 結果에서서는 총 實驗菌株中 中等度 以上의 毒性을 일으키는 菌株가 21株이었고 40株는 輕度의 毒性을 나타내었다.

4. 電子顯微鏡을 通한 마우스 肝細胞의 構造變化를 보면 肝實質 細胞의 focal necrosis 및 inflammatory reaction을 나타내었음과 同時에 核의 變化 粗面小胞體의 종창 내지 에포화 mitochondria의 종창, cristae의 소실, lipid 및 glycogen dropl et의 증가현상등이 관찰되었고 이는 HeLa 細胞株의 微細構造도 類似하였다.

5. HeLa 細胞株 및 mouse를 利用한 mycotoxin의 screening은 screening 方法中 可能한 한가지의 方法으로 생각된다.

6. 除毒効果에 對한 實驗成績은 紫外線을 利用한 結果를 보면 24時間 處理한 경우 90%以上이 파괴변화되는 것을 볼 수 있었으며 混合培養한 경우 毒素 非分泌菌株를 混合하였을 경우 많은 例에서 毒性의 變化現象을 觀察할 수 있었다. 그러나 이는 모든 例에서 一致하는 것은 아니었다.

「本硏究는 1976年度 産學協同 硏究費로서 行하여 졌으며 本 硏究費를 補助하여 주신 産學協同財團에 감사드린다.」

參 考 文 獻

Ashowth, L.J. and McMeans, J.L.: *Association of Aspergillus flavus and aflatoxions with a greenish yellow fluorescence of cotton seed, Phytopath., 56:1104, 1966.*

Asplin, F.D. and Carnaghan, R.B.A.: *The toxicity of certain groundnut meals for poultry with special reference to their effect on duckling and chickens, Vet. Record, 7:1215, 1961.*

Austwick, P.C.K. and Ayerst, G.: *Ground nut microflora and toxicity, Chem. Ind., 1963.*

Barnett, H.L.: *Illustrated genera of Imperferti fungi, Burgess Pub. Co., 1958*

Broadbent, J.H., Cornelius, J.H. and Snone, G.: *The detection and estimatoin of aflatoxin in groundnuts and groundnut materials, Analyst, 88:214, 1963.*

Erown, R.F., Wildman, J.D. and Eppley, R.M.: *Temperature dose relationship with aflatoxin on the brine shrimp Artemia salina, J. AOAC., 51:906, 1968.*

Butler, W.H.: *Liver iujury and aflatoxin, in "Mycotoxins in Foodstuffs" (G.N. Wogan, ed.) M.I.T. Press, Cambridge, 1965.*

Cho, S.H., Koh, C.M., Choi, T.J. and Lew, J.: *Studies on the population of toxigenic fungi in foodstuffs, J. Kor. Soc. Microbiol., 8:43, 1973.*

Christensen, C.M.: and Gordon, R.D.: *The mold flora of stored wheat what and corn and its relation to heating of moist grains, Cereal Chem., 25:40, 1960.*

Christensen, C.M.: *Fungi cereal grains and their products. In Mycotoxins in Foodstuffs,*

Cambridge, 1965.

Christensen, C.M.: *Deterioration of stored grains by fungi, Botanical Rev., 23:108, 1957.*

Christensen, C.M., Nelson, G.H., Mirocha, C.J. and Bates, F.: *Toxicity to experimental animals of 643 isolates from fungi, Cancer Res., 28:2293, 1968.*

Chung, Y., Lee, B.J., and Kwon, S.P.: *Effects of r-ray irradiation on Asp. flavus and the prodnction of aflatovin, Kor. Cent. J. Med., 21:413, 1971.*

Ciegler, A., Lillehoj, E.B.: *Mycotoxins, Adv. Appl. Microbiol., 10:155, 1968.*

Ciegler, A., Lillehoj, E.B., Peterson, R.E. and Hall, H.H.: *Microbial detoxification of aflatoxin, Appl. Microbiol., 14:934, 1966.*

Coomes, T.J. and Sanders, J.C.: *The detection and estimation of aflatoxin in groundnuts and ground nut materals, Analyst, 88:209, 1963.*

Coomes, T.J., Corwther, P.C., Franceis, B.J. and Shone, G.: *The detection and estimation of aflatoxin in groundnuts and groudnut materials* (Ⅲ), *Analyst, 89:436, 1964.*

Cuthbertson, W.F.L., Laurson, A.C. and Prat, D.A.H.: *Effect of ground nut meal containing aflatoxin oncynomologus monkey, Brit. J. Cancer, 17:691, 1967.*

Davis, N.D., Diener, U.L., and Eldridge, D.W.: *Production of aflatoxin G. by Asp. flavus in a semisynthetic medium, Appl. Microbiol., 14 : 378, 1966.*

Deung, Y.K., Koh, C.M., Kim, S.K., Sohn, W. J. and Lew, J. : *Electron microscopic observations of mouse liver cell treated with fungal culture filtrates isolated from foodstuffs(I), New Med. J., 17 : 101, 1974.*

Deung, Y.K., Choi, C.K. and Koh, C.M.: *Electron microscopic observations of mouse liver cell treated with fungal culture filtrates isolated from foodstuffs (II), Kor. J. Elect. Micr-oscopy, 3 : 45, 1973.*

Dollear, F.G. and Gardner, H.K.Jr.: *Inactivation and removal of aflatoxin, Proc. 4th rat. Peanut Res, Conf., Tifton, Georgia, July 14, p.72, 1966.*

Enomoto, M. and Saito, M.: *Carcinogens produced by fungi Ann. Rev. Microbiol., 26 : 279, 1972.*

Gablick, J., Schaeffer, W., Friedman, L. and Wogan, G.N.: *Effect of aflatoxin B_1 on cell culture, J. Bact., 90 : 720, 1965.*

Garren, K.H.: Peanut microflora and pathogenesis in peanut pcoduct, Phytopathol. Z., 55 : 359, 1966.

Goldblatt, L.A.: *Chemistry and control of aflatoxin, Pure Appl. Chem., 21 : 331,, 1970.*

Harley, E.H., Rees, K.R. and Cohen, A.: *A comparative study of the effect of aflatoxin B: and actinomycine D on HeLa cells, Biochem. J., 114 : 289, 1969.*

Kim, C.S.: *Fine structural chauges and autoradiographic studies of rat liver cells induced by aflatoxin B_1, Yonsei J. Med. Sci., 4:80, 1971.*

Kim, Y.H., Hwangbo, J.S. and Lee, S.R.: *Detection of aflatoxins in some Korean foodstuffs, Korean J. Food Sci. Technol., 9:73, 1977.*

Koh, C.M. and Lew, J.: *Studies on the classification and amylase producing activity of fungi isolated from various local grains and fermented pastes, J. Kor. Soc. Microbiol., 5 : 19, 1970.*

Koh, C.M., Choi, T.J. and Lew, J.: *Studies on the population of toxigenic fungi in foodstuffs, Kor. J. Mycology, 1 : 17, 1973.*

Koh, C.M., Kim, S.K., Cho, S.H., Kim, S.J., Choi, T.J. and Lew, J. : *Studies on the population of toxigenic fungi in foodstuffs, Kor. J. Appld. Microbiol. Bioeng., 2 : 19, 1974.*

Koh, C.M. and Lew, J.: *Studies on the population of toxigenic fungi in foodstuffs, Yonsei Med. J., 15 : 74, 1974.*

Koh, C.M., T.K. and Lew, J.: *Studies on the toxigenic fungi isolated from local grains and foodstuffs, J. Kor. Soc. Microbiol., 10 : 39, 1975.*

Kobayashi, K., Sakai, F., Tsukioka, M., Noguchi, Y., Tatsuno, T., *Saito, M.*, Sato, Y., Miyake, M., Saito, Enomoto, M., Shikata, T. and Ishika, P.: *Toxicological studies on the yellowed rice by P. islandicum Sopp, Proc. Japan Acad., 34 : 139, 1958.*

Kurata, H., Udagawa, S., Ichinoe, M., Kawasaki, Y., Takada, M., Tazawa, M., Koizumi, A. and Tanabe, H.: *Studies on the population of toxigenic fungi in foodstuffs, J. Food Hyg, Japan, 9 : 23, 1968.*

Lee, B.H., Chun, Y. Y., Choi, Choo, H.K., Kim, S.J. and Chung, S.K.: *Productivity of aflatoxin by Korean industrial strains of the Aspergilli, J. KonKuk Univ., 12:807, 1917.*

Legator, M.S. and Withrow, A.: *Aflatoxin: Effect on mitotic division in cultured embryonic lung cells, J. AOAC, 47 : 1007, 1964.*

Lew, J. and Koh, C.M.: *Study on mycotoxins in Korean fermented foodstuffs, Yonsei Nonchong, 8 : 3, 1970.*

Lew, J., Kwon, S.P., Chung, Y. and Koh, C.M.: *Study on mycotoxins in Korean fermented foodstuffs, Yonsei Nonchong, 7:192, 1969.*

Lee, T.Y. and Lee, S.K.: *Studies on toxic metabolites occurring in foods, J. Kor. Assoc. Food Sci., 1 : 78, 1969.*

Lie, J.L. and Marth, E.H.: *Formation of aflatoxin in chedder cheese by Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus, J. Dairy Sci., 50 : 1708, 1967.*

Luft, J.H: *Improvement in epoxy resin embedding method, J. Biophy Biochem. Cytol., 11:736, 1961.*

Mathaven, T.V. and Gopalan, C.: *Effect on dietary protein on aflatoxin liver injury in wealling rats, Arch. Pathol., 80 : 123, 1965.*

Mann, G.E., Coldifer, L.P.Jr., and Dollear, F.G.: *Effect of heat on aflatoxins in oilseed meals, J. Agr. Food Chem., 15 : 1090, 1967.*

Murakami, H., Sagawa, H. and Takase, S.: *Non-productivity of aflatoxin by Japanese industrial strain of Aspergillus, J. Gen. Appl. Microb., 14 : 251, 1968.*

Newbernne, P.M. and Butler, W.H.: *Acute and chronic effects of aflatoxin on the liver of domestic and laboratory animals: A review, Cancer Res., 29 : 236, 1969.*

Palade, G.E.: *A study of fixation for electron microscopy, Exp., 95 : 285, 1952.*

Raper K.B. and Fennel, D.I.: *The genus Aspergillus, Williams and Wilkins, Co., Baltimore, 1965.*

Raper, K.B. and Thom, C.: *A manual of the Penicillia, Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1953.*

Robert, J.C.: *Studies in mycological Chemistry, J. Chem. Soc., 2 : 278, 1970.*

Saito, M., Ohtsubo, K., Umeda, M., Enomnto, M., Kurata, H., Udagawa, S., Sakabe, F., and Ihinoe, M.: *Screening tests using HeLa cells and mice for detection of mycotoxin producing fungi isolated from foodstuffs, Jap. Exp. Med., 41 : 1, 1971.*

Salmon, W.D. and Newberne, P.M.: *Occurrence of hepatomas in rat fed diets contaiming peanut meal as a major source of protein, Cancer Res., 23 : 571, 1963.*

Schroeder, H.W. and Hein, H.Jr.: *Effect of diurnal temperature cycles on the production of aflatoxin, Appl. microbiol., 16:988, 1967.*

Scott P.M.: *Note on analysis of aflatoxins in B green coffee, J. AOAC, 51 : 609, 1968.*

Svoboda, D., Grady, H. and Higginson, J.: *Aflatoxin B_1 injury in rat and monkey liver, Am. J. Pathol., 49 : 1023, 1966.*

Toplin, I.: *A tissue culture cytotoxicity test for large scale cancer chemotherapy screening, Cancer Res., 19 : 959, 1959.*

Trager, W. and Stoloff, L.: *Possible reaction for aflatoxin detoxification, J. Agr. Food Chem., 15 : 679, 1967.*

Ueno, Y., Tsunoda, H., Enomoto, M. and Ohtsubo, K.: *Toxicological approaches to the metabolties of Fusaria, Jap. J. Exp. Med., 41 : 521, 1971.*

Uraguchi, K., Sakai, F., Sukioka, M., Noguchi, Y., Tatsuno, T., Saito, M., Ishiko, T.,

Enomoto, M., Shikata, T. and Miyake, M.: *Acute and chronic toxicity in mice and rats of the fungus mat of P. islandicum added to the diet, Jap. J. Exp. Med., 31 : 435 1961.*

Wallace, H. A. H. and Sinba, R. N.: *Fungi associated with hot spots in farm stored grains, Canad. J. Plant Sci., 42 : 130, 1962.*

Wogan, G. N.: *Aflatoxin risks and control measures, Fed. Proc., 271 : 932, 1968.*

Wright, D. E.: *Toxins produced by fungi, A. Rev. Microbiol., 221 : 269, 1968*

Zuckerman, A. L., Rees, K. R., Inman, D. R. and Robb, I. A.: *The effects of aflatoxins in human embryo liver cells in culture, Brit. J. Exp. Pathol., 49 : 33, 1968.*

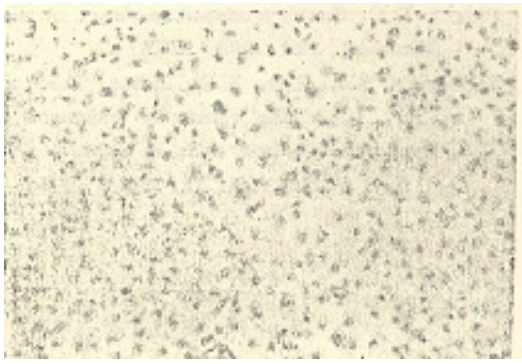

사진 1. 정상 HeLa 세포주, H-E 염색.

사진 2. 독신분비균주의 배양여과액으로 처리된 HeLa 세포주의 독성 "3"의 변화형태. H-E 염색.

사진 3. 표준균주 *Asp.flavus* ATCC 15517주에 의한 간실질세포의 국소적괴사와 염증현상. H-E염색.

사진 4. 실험균주의 배양여과액으로 처리된 간실질세포의 국소적 괴사와 염증현상. H-E염색.

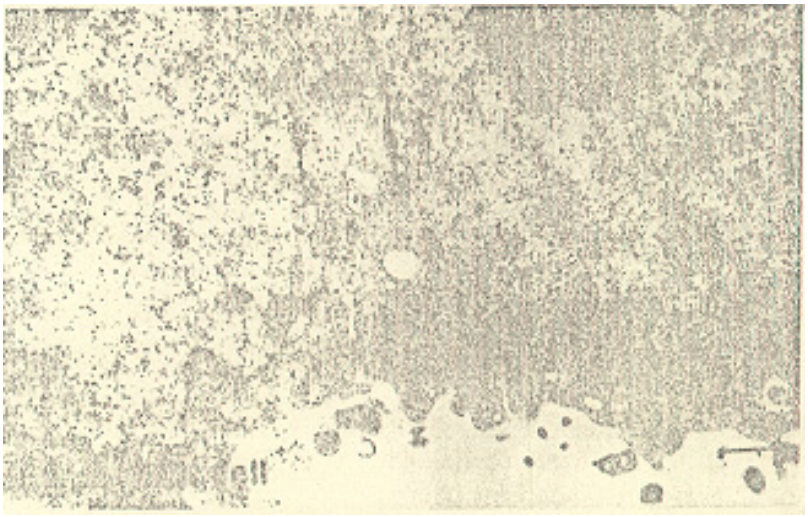

사진 5. 정상 HeLa 세포의 전자현미경적소견으로서 정상적인 형태의 핵과 인을 볼 수 있으며 잘 발달된 조면소포체 및 mitaohondria가 보인다.

사진 6. 배양여과액으로 처리된 HeLa세포로서 불규칙한 핵막과 핵막에 부착된 仁을 관찰할 수 있으며 조면세포체의 종창 및 액포화, 그리고 변화된 mitochondria가 보인다.

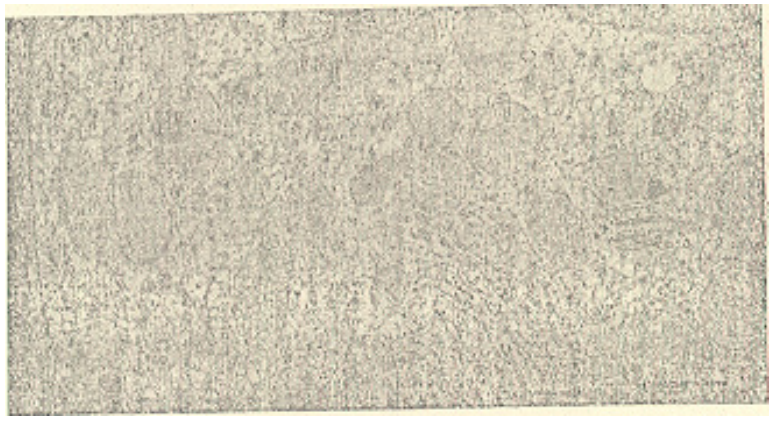

사진 7. 정상적인 마우스 간세포로서 잘 발달된 mitochondria, 조면소포체등을 볼 수 있다.

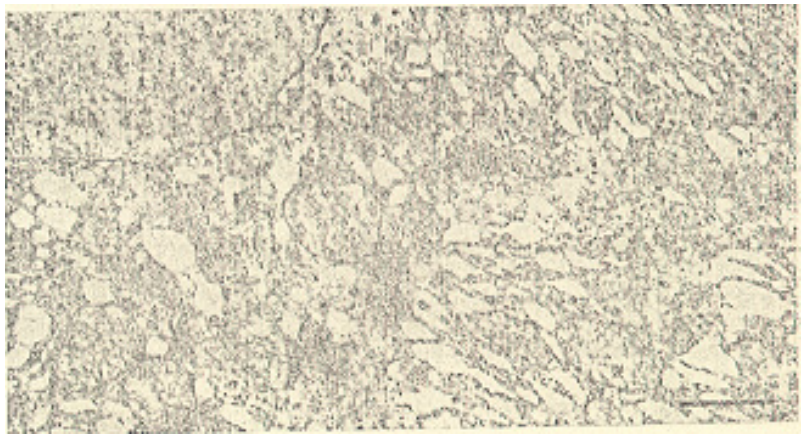

사진 8. 배양여과액으로 처리된 마우스간세포로서 불규칙한 핵막, 조면세포체의 종창 및 액포화 그리고 변화된 mitochondria를 볼 수 있다.