



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

생활 과학 석사 학위 논문

배양 조건에 따른
Aspergillus 속의 독소 생산
및 공동 배양을 통한
aflatoxin 의 생산 저해

**Effect of Culture Conditions on Mycotoxin
Production and Inhibition of Mycotoxin by Coculture**

2016 년 8 월

서울대학교 대학원
식품영양학과
이유나

국문 초록

Ochratoxin A 와 aflatoxin 은 통제되지 않는 환경에서 발효식품을 생산하여 식품이 곰팡이 독소 생산 곰팡이에 오염되었을 경우나 곰팡이 독소 생산 균주를 분별없이 발효식품의 starter 로 사용하였을 때 검출될 수 있다. Ochratoxin A 은 국제암연구소(IARC)에서 group 2B 의 발암물질로 지정되어있다. aflatoxin B₁ 은 악성 종양을 일으킬 수 있는 group 1 의 발암물질이며 태아의 기형을 발생시킬 수 있다. 두 곰팡이 독소 모두 식품공전에 허용량이 정해져 관리되고 있다.

이 연구는 *Aspergillus usamii* FMB S999 (A. 999), *A. awamori* FMB S983 (A. 983), *A. flavus* FMB S41403 (A. 41403), *A. oryzae* FMB S46471 (A. 46471) 을 배양 조건을 달리하여 배양 조건이 곰팡이 독소의 생산에 미치는 영향을 분석하였다. 또한 LAB 와 *S. cerevisiae* 를 A. 41403 과 공동배양하여 aflatoxin 억제에 뛰어난 균주를 찾고자 하였다.

A. 999, A. 983 는 potato dextrose agar (PDA), czapek yeast extract agar (CYA) 배지에서 10°C, 20°C, 30°C 조건에서 10 일, 20 일, 30 일간 배양하였다. Aflatoxin 생산에는 potato dextrose broth(PDB), czapek yeast extract broth (CYB)배지를 pH 4.0, pH 6.0, pH 8.0 이 되도록 조정하고 A. 41403 와 A. 46471 를 접종하여 10°C, 20°C, 30°C에서 10 일, 20 일, 30 일간 배양하였다.

23 가지의 *Lactobacillus* 속 및 *S. cerevisiae* 를 첨가한 de Man Rogosa and Sharpe (MRS) broth 에 A. 41403 과 공동 접종하여 30°C에서 배양하였다.

A. 46471 는 분석 결과 모든 조건에서 aflatoxin 을 생산하지 않았다. A. 999, A. 983 는 30℃에서 가장 많은 ochratoxin A 를 생산하였다. A. 999 는 CYA 배지에서 ochratoxin A 를 적게 생산하였으며 A. 983 은 PDA 배지에서 ochratoxin A 를 더 적게 생산하였다. Aflatoxin 생산 역시 30℃에서 가장 활발하였다. 40℃에서는 균주의 성장과 관계 없이 가장 적은 양의 독소가 생산되었다.

공동 배양한 23 가지 균주 중 20 가지에서 aflatoxin 의 생산량이 억제되었다. LAB 보다는 *S. cerevisiae* 에서 더 높은 저해율을 보였으며 *S. cerevisiae* KCTC 7904 와 *L. acidophilus* KCTC 3142 균주가 가장 적합한 것으로 나타났다.

본 연구의 결과는 ochratoxin A 와 aflatoxin 의 생산 조건을 분석하고 곰팡이 독소의 생산을 저해하는 균주를 찾고자 하였다.

주요어: 오크라톡신 A, 아플라톡신, *Aspergillus* 속, 공동배양, 유산균, *Saccharomyces cerevisiae*

학 번: 2014-20359

목 차

국문초록	i
목 차.....	iii
그림목차	iv
표목차.....	v
1. 서론	1
2. 재료 및 방법	5
2.1. 사용 균주.....	5
2.2. 배지 제조 및 배양 조건.....	6
2.3. 생장 분석.....	7
2.4. 곰팡이 독소 추출	8
2.5. Ochratoxin A 와 aflatoxin 정량 분석.....	9
2.6. 통계처리	10
3. 결과 및 고찰	14
3.1. 배양조건에 따른 ochratoxin A 의 생산과 균주의 생장	14
3.2. 다양한 배양 환경에서 A. 41403 의 독소 생산량 및 건조 중량	24
3.2. A. 41403 과 경쟁 균주의 공동 배양.....	36
4. 요약 및 결론	44
참고문헌	46
Abstract	51

그림목차

Fig. 1. Structure of AF and OTA.....	4
Fig. 2. Chromatographic profiles of mixture of AF standards analyzed by HPLC.....	12
Fig. 3. Chromatographic profile of OTA standard analyzed by HPLC	13
Fig. 4. Production of ochratoxin A by <i>Aspergillus</i> at different temperature in various environments for 10, 20 and 30 days ...	16
Fig. 5. Production of total AF/D.W. from different medium and different initial pH for 10, 20 and 30 days	26
Fig. 6. Result of final pH grown under different medium and different initial pH for 10, 20 and 30 days at 40°C.....	27
Fig. 7. Result of tAF/D.W. produced by <i>A. 41403</i> grown in MRS media.....	38
Fig. 8. Result of tAF produced by <i>Aspergillus</i> during coculture with <i>Lactobacillus</i> sp. and yeasts in MRS broth.....	39

표 목 차

Table 1. <i>Lactobacillus</i> and <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strains used for coculture with <i>A. flavus</i> FMB S41403.....	11
Table 2. Detection of Ochratoxin A/colony diameter from PDA and CYA at different temperature	17
Table. 3. Growth of <i>A. 999</i> and <i>A. 983</i> under different cultivate environments	18
Table 4. Mean rank of OTA/cm ² and colonies diameter	19
Table 5. Mean rank of OTA/cm ² and colonies diameter at different temperature	20
Table 6. Mean rank of OTA/cm ² and colonies diameter of <i>A. 999</i> and <i>A. 983</i> grown at different temperature	21
Table 7. Mean rank of OTA/cm ² and colonies diameter in various media.....	22
Table 8. Mean rank of OTA/cm ² and colonies diameter grown in PDA and CYA.....	23
Table 9. Production of aflatoxin B ₁ /D.W. and B ₂ /D.W. grown in various pH medium at 15°C by <i>A. 41403</i>	28
Table 10. Production of aflatoxin/D.W. by <i>A. 41403</i> produced in different media at 30°C	29

Table 11. Detection of Aflatoxin B ₁ /D.W. and B ₂ D.W. produced at 40°C by <i>A. 41403</i>	30
Table 12. Dry weight of <i>Aspergillus</i> mycelium incubated at 15°C, 30°C and 40°C in different media	31
Table 13. Mean rank of tAF/D.W., final pH and dry weight	32
Table 14. Mean rank of tAF/D.W. and dry weight in PDB and CYB media.....	33
Table 15. Mean rank of tAF/ D.W. and dry weight at 15°C, 30°C and 40°C.....	34
Table 16. Mean rank of tAF/ D.W. and dry weight at 15°C, 30°C and 40°C in different media.....	35
Table. 17. Results of cell number, pH, dry weight, AFB ₁ , AFB ₂ , and tAF/D.W. cocultured with <i>Lactobacillus</i> sp. and <i>S. cerevisiae</i> ...	41
Table. 18. Mean rank of cell number, pH, dry weight, tAF and tAF/ D.W.....	42
Table. 19. Average of CFU, pH, pH change, dry weight, tAF and tAF/ D.W.	43

약 어 요 약

AF: Aflatoxin

AFB₁: Aflatoxin B₁

AFB₂: Aflatoxin B₂

A. 41403: *Aspergillus flavus* FMB S41403

A. 46471: *Aspergillus oryzae* FMB S46471

A. 983: *Aspergillus awamori* FMB S983

A. 999: *Aspergillus usamii* FMB S999

D.W.: Mycelium dry weight

LAB: Lactic acid bacteria

OTA: Ochratoxin A

tAF: Aflatoxin B₁, B₂의 총합

1. 서론

곰팡이 독소는 곰팡이에 의해 2차 대사산물로 생산되며 여러 종류 식품에서 발견된다[1, 2].

Aflatoxin(AF)은 옥수수, 땅콩, 곡류, 고추에서 검출되며 Ochratoxin A(OTA)는 맥주, 와인, 막걸리, 곡류, 커피콩 등에 오염을 일으키는 것으로 보고되었다[3-10].

AF를 생산하는 곰팡이로는 *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. tamari*, *A. bombycis* 등이 있다[11, 12]. Ochratoxin A는 *A. awamori*, *A. usamii*, *A. costaricaensis*, *A. ochraceus*, *A. niger*, *A. lacticoffeatus*, *A. sclerotium*, *Penicillium verrucosum* 등의 곰팡이가 생산한다고 보고되고 있다[13-17].

AF의 주요한 형태로는 aflatoxin B₁, aflatoxin B₂, aflatoxin G₁, aflatoxin G₂, aflatoxin M₁, aflatoxin Q₁가 알려져 있다. ochratoxin은 ochratoxin A (OTA), ochratoxin B, ochratoxin C (the ethyl ester of ochratoxin A)가 있으며, OTA와 ochratoxin B의 phenylalaninyl기 대신 OH기가 붙는 ochratoxin α , ochratoxin β 등이 알려져 있다[15, 18].

AF은 international agency for research on cancer (IARC)에 의해 최고 group 1 발암물질로 분류되며, 급성 간염, 면역계의 손상 등의 문제를 야기한다[19]. OTA는 group 2B의 발암물질로 분류되어 있으며 기형아 출산을 일으키고 간 독성, 신세포독성 등을 가지고 있다[20].

이러한 곰팡이 독소 섭취에 의한 피해를 방지하기 위해 국가적으로 식품에서의 곰팡이 독소 함량에 대한 제한을 설정해두고 있다[21].

곰팡이의 성장과 곰팡이 독소의 생산은 온도, pH, 성장 기간에 영향을 받기 때문에[22-24] 식품에서 곰팡이 독소의 오염에 주의하여 적절한 환경이 되도록 유지하며 곰팡이 독소가 생산되는 조건을 피하는 것은 식품의 안전을 위해서 그리고 경제적으로도 중요하다.

Aflatoxin B₁(AFB₁)의 최적 생산 온도는 20-30°C로 보고되어 왔으며[25] 넓은 범위의 pH에서 생산되는 것이 알려져 왔다[19]. OTA는 15-40°C에서 검출되는 것이 보고되었다[26, 27]. 그러나 pH, 온도, 배양기간 등의 여러 요소를 여러 배지에서 한 번에 비교한 연구는 부족하며 각 조건들 간의 상호작용에 대해서는 잘 알려져 있지 않아 연구의 필요성이 있다. 또한 이를 통하여 곰팡이 독소의 위험을 낮출 수 있을 것이다.

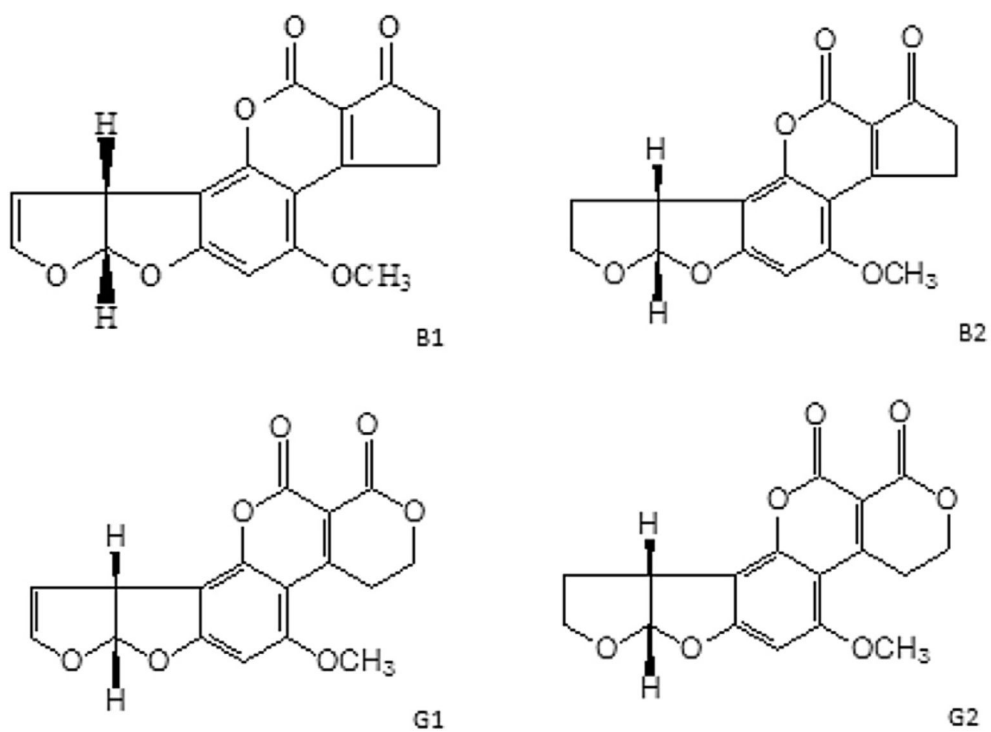
몇몇 화학적 살진균제가 곰팡이의 성장을 억제하여 곰팡이 독소의 위험을 낮출 수 있으나 잔여물의 염려가 있다[28]. 따라서 생물학적으로 aflatoxin의 오염 위험을 낮추고자 하는 연구가 진행되어 왔다[29]. Aflatoxin은 *Lactobacillus sp.*나[30] *Bacillus subtilis*[31], 다른 곰팡이에 의해[32] 억제되는 것으로 보고되었다. 그 중 LAB와 *S. cerevisiae*는 전통적으로 음식의 발효나 빵 효모로 사용되어져 왔다[33].

LAB와 *Saccharomyces cerevisiae*는 aflatoxin을 흡수하여 aflatoxin의 위험을 낮출 수 있는 것이 알려져 있다[34]. LAB의 경우 유기산, phenolic compounds, 과산화수소 등의 항곰팡이 대사물질을 생성하며 곰팡이 독소의 생산을 방해할 수 있으며[35] 곰팡이의 포자의 발아를 방해하는 역할을 하기도 한다[36]. 이를 이용하여 곰팡이와의 공동 배양을 통해 독소의 생산을 억제할 수 있고[37] 균 배양액의 상등액만을 첨가하여도 곰팡이의 성장과 aflatoxin의 생산을 저해 할 수

있다[36].

따라서 본 연구에서는 OTA와 AF이 생산되는 조건을 분석하여 식품에서 곰팡이 독소의 오염을 줄일 수 있는 조건을 탐색하고 공동배양을 통하여 aflatoxin의 생산을 효과적으로 억제 할 수 있는 균주를 찾고자 하였다.

(A)



(B)

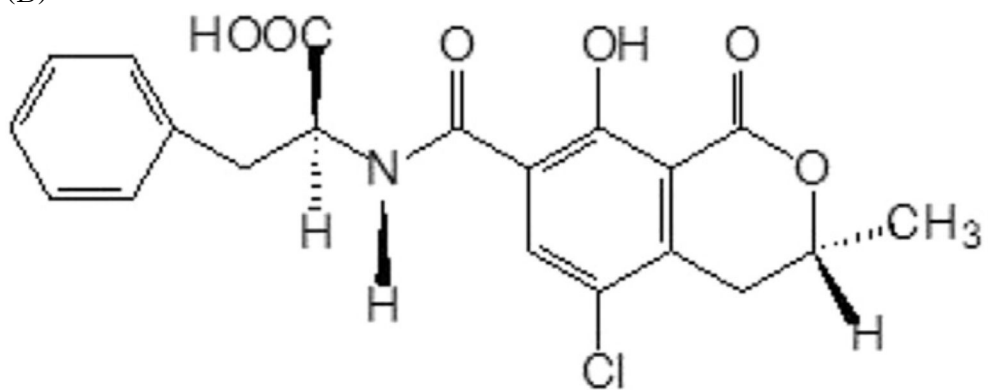


Fig. 1. Structure of AF and OTA; (A) structure of aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂; (B) structure of ochratoxin A[38]

2. 재료 및 방법

2.1. 사용 균주

사용된 균주들은 Korea Food Research Institute (KFRI: Gyeonggi-do)와 Korean Agricultural Culture Collection (KACC: Gyeonggi-do), Korean Collection for Type Cultures (KCTC: Jeollabuk-do)에서 제공받았다. 사용된 균주들은 서울대학교 식품영양학과 식품미생물연구실에서 보관 중인 균주를 사용하였다. OTA 생산균주로는 *Aspergillus usamii* FMB S999 (A. 999)와 *Aspergillus awamori* FMB S983 (A. 983)가 사용되었다[39]. Aflatoxin 생산 균주로는 AFB₁과 aflatoxin B₂ (AFB₂)를 생산하는 *Aspergillus flavus* FMB S41403이 사용되었으며 음성 대조균으로는 *Aspergillus oryzae* FMB S46471을 사용하였다[40]. 공동 배양 균주는 Table 1에 기재하였다. 모든 곰팡이 균주들은 potato dextrose agar (PDA) (Difco™, Detroit, MI, USA)에서 7일간 30℃, 호기 조건으로 배양하였고 포자 현탁액을 제조하여 실험에 사용하였다. *Saccharomyces cerevisiae* 균주는 yeast extract peptone dextrose (YPD) broth 배지에 1% 접종하여 30℃에서 배양하여 1번 계대 배양 후 사용하였다. *Lactobacillus* 속의 균주들은 0.05% L-cysteine을 첨가한 de Man Rogosa and Sharpe (MRS) broth (Difco™, Detroit, MI, USA) 배지에 1% 접종하여 37℃에서 18시간 동안 2번 계대 배양하여 사용하였다.

2.2. 배지 제조 및 배양 조건

2.2.1. Ochratoxin A 분석 배지 제조 및 배양 조건

OTA 배양에는 PDA, czapek yeast extract agar (CYA)를 사용하였다. CYA는 1 L의 증류수에 K_2PO_4 1 g, czapek concentrate 10 ml, yeast extract 5 g, sucrose 30 g, agar 15 g을 포함하고 있다. Czapek concentrate는 100 ml의 물에 $NaNO_3$ 30 g, KCl 5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 5 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 g을 녹였다[41]. PDA와 CYA는 배양접시 (90 x 150 mm) (SPL Lifesciences Co. Ltd, Pocheon-si, Gyeonggi-do, Korea)에 30 ml씩 분주하였다. 포자현탁액은 1.00×10^5 spores/g을 접종하였다. 배양기에서 온도 조건 15°C, 30°C, 40°C에 호기적으로 10일, 20일, 30일간 배양하였다.

2.2.2. Aflatoxin 분석 배양 배지 제조 및 배양 조건

Aflatoxin 배양에는 potato dextrose broth (PDB) (Difco™, Detroit, MI USA), czapek yeast extract broth (CYB)를 사용하였다. CYB는 CYA배지에서 agar를 제외하고 제조하였다. 배지는 최종적으로 1 N NaOH (Samchun, Pyeongtaek city, Gyeonggi-do, Korea), 5 N NaOH, 1 N citric acid (Samchun)에 의해 pH 4.0, pH 6.0, pH 8.0로 조정되었다. PDB, CYB는 30 ml를 100 ml 삼각플라스크에 분주하여 면전으로 막았다. 포자 현탁액은 6.00×10^6 spores/ml를 접종하였고 진탕 배양기에서 배양하였다. 온도는 15°C, 30°C, 40°C로 맞추었으며 150 rpm에서 호기적으로 배양하였다. 시료는 10일째, 20일째, 30일째에 수거하였다.

2.2.3. *A. flavus* KCTC 41403과 *Lactobacillus* sp. 및 *Saccharomyces cerevisiae*의 공동배양

공동 배양 배지는 MRS broth를 100 ml 삼각플라스크에 30 ml씩 분주하고 150 rpm, 30°C에서 10일간 배양하였다. 18시간 동안 배양한 균을 4°C, 10000 rpm에서 30분간 원심 분리한 후 상층액을 제거하였다. 균체를 0.9% NaCl 용액에 재부유시키고 희석하여 Mcfarland 탁도 3에 맞추어 1% (v/v)접종하였다. *A.* 41403과 *S. cerevisiae*는 3.00×10^6 spores만큼씩 접종하였다.

2.3. 성장 분석

2.3.1. Ochratoxin 생산 곰팡이의 성장 측정

평판배지에서 성장한 각 균체의 지름을 측정한 후 평균을 내었다.

2.3.2. Aflatoxin 생산 균주의 건조 중량 측정

액체배지에 배양된 시료를 4°C에서 5000 rpm으로 15분간 원심 분리하였다. 원심 분리된 시료의 상등액을 제거한 후 증류수를 추가하여 원심 분리하는 과정을 두 번 반복하였다. 그 후 칭량병에 시료를 옮겨 담고 110°C의 온도에서 건조하여 중량을 측정하였다.

2.3.3. 공동 배양 시 *A.* 41403의 건조 중량 측정

Plastic filter holder를 이용하여 시료 내의 *A.* 41403과 효모 및 유산균 균체를 분리하고 50 ml의 증류수를 추가로 흘려보냈다. 걸러진 균체를 110°C에서 건조하고 중량을 측정하였다.

2.3.4. 공동 배양 균주의 생균수 측정

10일간 배양한 균 액을 0.9% NaCl 용액에 10배씩 희석하였다. LAB는 MRS agar에 접종하여 37°C에서 3일간 배양하였으며 *S. cerevisiae*는 YPD agar에 도말하여 30°C에서 3일간 배양하였다.

2.4. 곰팡이 독소 추출

2.4.1. Ochratoxin A 추출

배양이 끝난 시료에 30 g에 맞추어 증류수를 추가하였다. OTA의 추출과 분석에는 high performance liquid chromatography (HPLC)와 immunoaffinity column을 이용하였다[42]. 수거된 시료를 cell strainer (BD Biosciences, Bedford, MA)로 균질화시켰다. 동량의 추출용매 (water-acetonitrile (Duksan Pure Chemicals Co., Ltd., Korea) [40:60, vol/vol])와 섞어 100 ml 삼각플라스크와 마그네틱바를 이용해 5분간 혼합하였다. 혼합된 시료를 Whatman no.4 filter paper (Whatman International Ltd., Maidstone, England)로 여과하였다. 여과액 5 ml를 phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.5)으로 50 ml가 되도록 희석하였다. 희석액은 Whatman GF/A glass filter paper (Whatman)를 이용해 여과하고 여과액을 OchraTest WB column (Vicam Co., Milford, MA)에 1 초에 1 방울의 속도로 통과시켰다. Column을 10 ml의 증류수로 세척하고 1 ml의 methanol에 녹여서 추출하였다. Column에 통과시킨 1 ml의 methanol은 50°C에서 완전히 건조시켰다. 건조 후 1 ml의 acetonitrile-water-acetic acid (99:99:2, vol/vol/vol)에 녹이고 0.2 μ m-pore-size membrane filter로 여과하였다.

2.4.2. Aflatoxin 추출

Aflatoxin을 추출하고 HPLC로 정량 분석하였다[40]. 수거된 시료에 멸균 증류수를 추가하여 30 g까지 증량하고 추출용액 (Methanol, 0.1% NaCl)을 동량 추가하여 5분간 vortex하였다. 혼합액을 Whatman no.4 filter paper에 여과하고 1% tween 20으로 4배 희석하였다. 희석한 후 Whatman GF/A glass filter paper로 여과하였다. 20 ml의 여과액을 immunoaffinity column (AflaTest WB, Vicam Co.)에 1초당 1방울의 속도로 통과시켰다. Column을 10 ml의 증류수로 세척하였고 3 ml의 acetonitrile로 aflatoxin을 추출하였다. 추출물을 50℃에서 완전히 건조시킨 후 trifluoroacetic acid 200 μ l를 첨가하여 암소에서 15분간 방치하였다. 15분 후 800 μ l의 acetonitrile-water (20:80, vol/vol)용액을 추가하였다. 최종 1 ml의 시료는 0.45 μ m pore size membrane filter로 여과하여 HPLC 분석에 사용되었다.

2.5. Ochratoxin A와 aflatoxin 정량 분석

2.5.1. Ochratoxin A의 검출

OTA의 분석에는 Polaris C18-A column (250 mm long, 4.6 mm inside diameter, 5 μ m particle size; Agilent Technologies)를 사용하여 20 μ l의 시료를 주입하였다. 이동상으로는 acetonitrile-water-acetic acid (99:99:2, vol/vol/vol)를 사용하였으며 Ultimate 3000 HPLC systems (Thermo fisher Scientific, Waltham, MA)로 1 ml/min의 속도로 15분간 흘려주었다. Ochratoxin A의 검출에는 fluorescence detector를 사용하였다. (333 nm excitation, 460 nm

emission) 사용된 OTA standard는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)에서 구입하였다.

2.5.2. Aflatoxin의 정량 분석 조건

Aflatoxin G₁, G₂, B₁, B₂ standard (25 µg/ml)는 Trilogy Analytical Laboratory (Washington, MO)에서 구입하였다. 이동상 (acetonitrile-water (25:75. vol/vol)을 Polaris C18-A column에 1 ml/min의 속도로 흘려주었다. 시료는 20 µl를 주입하였고 fluorescence detector (360 nm excitation, 450 emission)를 사용하여 25분간 검출하였다.

2.6. 통계처리

통계분석은 Statistical Package for the Social Science (SPSS, Ver. 22.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하였다. Kruskal-Wallis test와 Mann-Whitney U test로 검정하였다. p값이 0.05 미만인 경우를 유의수준으로 고려하였다. 군간에 유의적인 차이가 있을 때는 Mann-Whitney U test를 Bonferroni 보정하여 사후 검정하였다. 공동 배양 결과 중 종속 변수 간의 영향은 선형회기분석으로 검정하였다.

<i>L. acidophilus</i> KCTC 2182	<i>L. acidophilus</i> KCTC 3151
<i>L. acidophilus</i> KCTC 3111	<i>L. acidophilus</i> KCTC 3154
<i>L. acidophilus</i> KCTC 3140	<i>L. acidophilus</i> KCTC 3168
<i>L. acidophilus</i> KCTC 3142	<i>L. acidophilus</i> KCTC 3171
<i>L. acidophilus</i> KCTC 3146	<i>L. acidophilus</i> KFRI 217
<i>L. acidophilus</i> KCTC 3150	

<i>L. casei</i> KCTC 3110	<i>L. casei</i> KFRI 699
<i>L. casei</i> KFRI 196	<i>L. casei</i> KFRI 704

<i>L. brevis</i> GABA 100	<i>L. brevis</i> KFRI 353
<i>L. brevis</i> KFRI 239	

L. delbrueckii KCTC 1047

L. delbrueckii subsp. *bulgaricus* KCTC 3188

L. lactis KCTC 2013

L. plantarum KFRI 708

<i>S. cerevisiae</i> KCTC 7904	<i>S. cerevisiae</i> KCTC 7915
<i>S. cerevisiae</i> KCTC 7913	

Table 1. *Lactobacillus* and *Saccharomyces cerevisiae* strains used for coculture with *A. flavus* FMB S41403

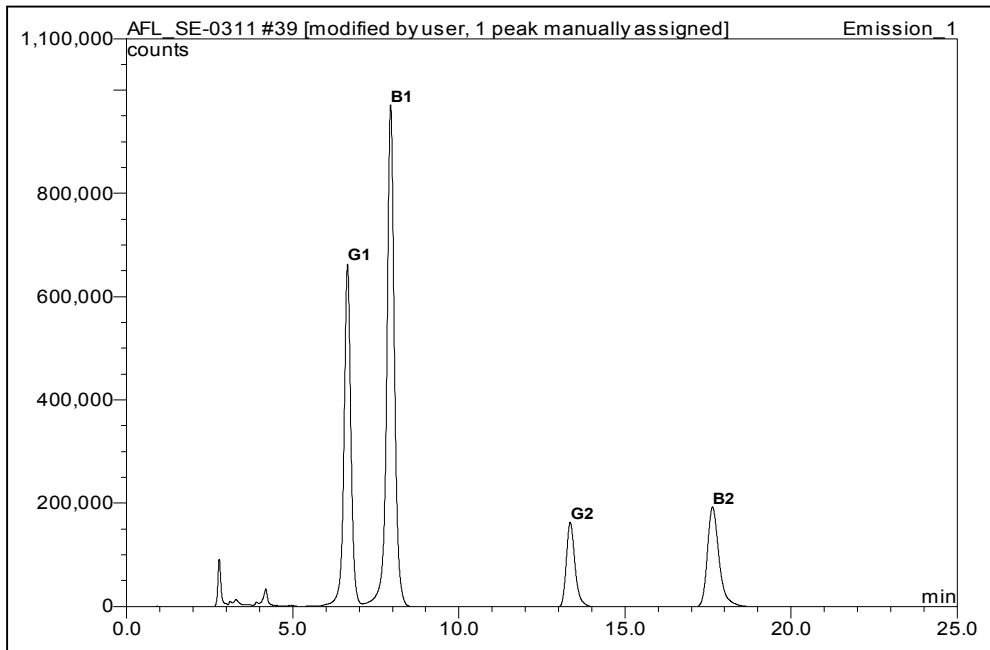


Fig. 2. Chromatographic profiles of mixture of AF standards analyzed by HPLC

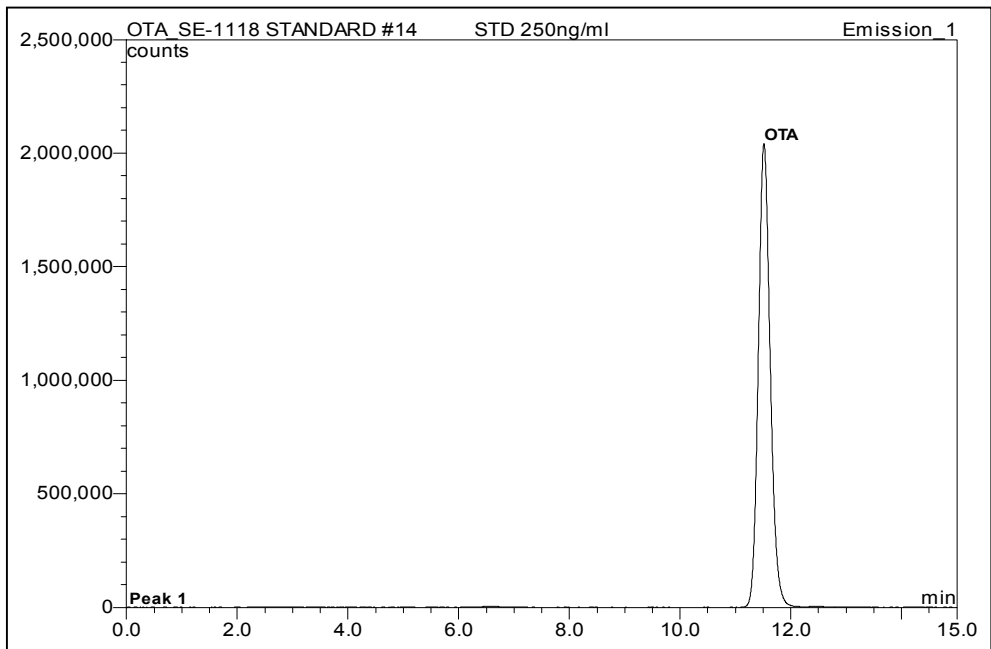


Fig. 3. Chromatographic profile of OTA standard analyzed by HPLC

3. 결과 및 고찰

3.1. 배양조건의 변화에 따른 ochratoxin A의 생산과 균주의 성장

A. 999와 A. 983를 온도, 배양 기간, 배지를 달리하여 배양하였다. 배양 결과는 Fig. 4와 Table 2-8에 나타내었다. OTA/cm²에서는 40°C에서 배양했을 때 가장 낮은 OTA가 검출되었다. 균체의 생장은 A. 999 균주를 PDA에 접종하여 15°C에서 배양하였을 때 1.9±0.1 cm로 가장 낮게 나타났다.

HPLC 분석 결과 온도 조건이 OTA의 생산량에 영향을 미치는 것으로 확인되었다. 균주의 성장에는 온도와 배양 기간, 배지가 영향을 미쳤다. (p<0.05)

A. 999의 경우 40°C에서는 OTA가 생산되지 않았고 균의 성장이 가장 낮게 나타났다. 15°C, 30°C에서는 15°C에서 30°C보다 OTA 생산과 균의 성장 모두 더 적은 결과를 보였다. A. 983은 15°C와 40°C간에 차이를 보이지 않았다.

15°C에서는 A. 983가 A. 999보다 더 많이 성장했으며 더 적은 OTA를 생산하였다. 40°C에서는 균주와 배지에 의한 차이 없이 가장 낮은 OTA가 생산되었으며 A. 983 균주가 더 낮은 성장을 보였다. 30°C에서 두 균주 모두 가장 많은 양의 OTA를 생산하였으며 균체의 성장 역시 가장 높았다.

OTA의 경우 기존의 연구에서는 yeast extract sucrose agar (YES)와 CYA에 *A. niger* 균주를 배양하였을 때 20-25°C에서 가장

많은 OTA 가 생산되었으며 35℃에서는 검출되지 않았거나 다른 온도에 비해 낮은 양이 생성되었다고 보고하였다[43]. *A. niger* 를 kernel 에 접종한 연구에서는 가장 OTA 생산량이 높은 때는 a_w 가 0.92 일 때 15℃이었으며 균체의 생장은 30–35℃가 가장 높다고 보고하였다[27].

30℃ 결과만을 보았을 때 *A. 999*를 배양한 경우 PDA에서의 생산량이 CYA에서보다 높게 나타났으며 *A. 983*의 경우에는 PDA에서 생산된 OTA의 양이 CYA에서의 양에 비해 낮게 나타났다.

PDA와 CYA에서 *A. niger*의 성장을 비교한 연구에서는 CYA에서 더 높은 성장을 보였다[44]. *Aspergillus ochraceus*를 특정한 종류의 탄소원을 공급하여 배양한 연구에서는 CYA에 함유되어 있는 sucrose가 fructose보다 높은 OTA 생산을 보였으며 당 농도가 높아질수록 OTA의 농도는 낮아짐을 보였다[45]. 그러나 *A. ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. tubingensis*를 다양한 종류의 탄소원에서 배양한 결과에서는 배지에 fructose를 첨가하였을 때 sucrose를 함유한 배지보다 많은 OTA가 생산되기도 하여 균주에 의한 차이가 있음을 보였다[44].

따라서 OTA 생산량에 공통된 조건은 온도로 높은 온도에서의 배양에서는 OTA의 위험이 감소한다고 할 수 있다.

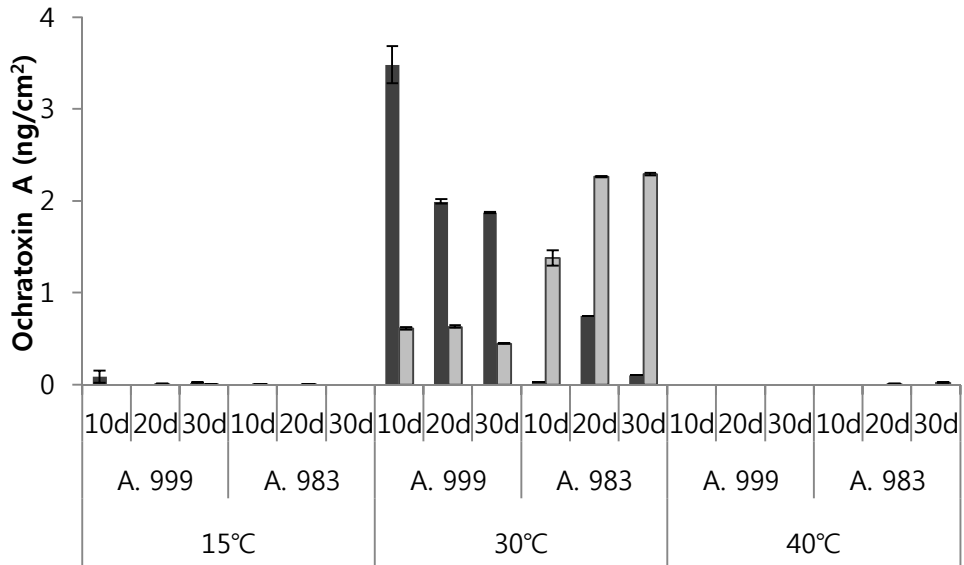


Fig. 4. Production of ochratoxin A/cm² by *Aspergillus* at different temperature in various environments for 10, 20 and 30 days; ■, PDA; □, CYA

Ochratoxin A (ng/cm ²)			PDA	CYA
Strains	Days	temp. ¹⁾		
A. 999	10 d	15°C	0.09±0.07	ND
		30°C	3.48±0.2	0.61±0.01
		40°C	ND	ND
	20 d	15°C	ND	0.01±0.02
		30°C	1.99±0.02	0.63±0.02
		40°C	ND	ND
	30 d	15°C	0.02±0.0	0.01±0.0
		30°C	1.87±0.01	0.45±1.6
		40°C	ND	ND
A. 983	10 d	15°C	ND	0.01±0.0
		30°C	0.03±0.0	1.38±0.08
		40°C	ND	ND
	20 d	15°C	ND	0.0±0.0
		30°C	0.75±0.0	2.27±0.01
		40°C	ND	0.01±0.0
	30 d	15°C	ND	ND
		30°C	0.11±0.0	2.29±0.02
		40°C	ND	0.02±0.0

Table 2. Detection of Ochratoxin A/colony diameter from PDA and CYA at different temperature

ND : < 0.1 μ g/kg

¹⁾ Temperature

Strains	Diameter (cm)		PDA	CYA
	Days	temp. ¹⁾		
A. 999	10 d	15°C	1.9±0.1	2.3±0.0
		30°C	3.8±0.0	3.7±0.1
		40°C	3.0±0.3	3.4±0.1
	20 d	15°C	2.2±0.1	3.1±0.2
		30°C	3.8±0.0	3.8±0.0
		40°C	3.1±0.2	3.4±0.0
	30 d	15°C	2.4±0.1	3.4±0.2
		30°C	3.9±0.1	3.8±0.1
		40°C	3.1±0.3	3.4±0.0
A. 983	10 d	15°C	2.0±0.1	2.9±0.1
		30°C	3.8±0.0	4.0±0.1
		40°C	3.8±0.1	2.8±0.2
	20 d	15°C	2.9±0.1	3.6±0.1
		30°C	3.8±0.1	4.0±0.1
		40°C	3.2±0.1	2.9±0.3
	30 d	15°C	3.2±0.0	3.7±0.1
		30°C	3.8±0.1	4.0±0.1
		40°C	3.3±0.1	3.0±0.2

Table. 3. Growth of *A. 999* and *A. 983* under different cultivate environments

¹⁾ Temperature

	OTA/cm ²			Colony diameter		
	OTA	A. 999	A.983	growth	A. 999	A.983
Temp.						
15°C	42.58 ^a	24.50 ^a	17.67 ^a	31.25 ^a	12.50 ^a	19.50 ^a
30°C	90.17 ^b	45.50 ^b	45.50 ^b	90.50 ^b	43.50 ^b	45.40 ^b
40°C	31.75 ^c	12.50 ^c	19.33 ^a	41.75 ^a	23.12 ^c	17.50 ^a
Days						
10 d	52.22	27.56	25.36	43.88 ^a	22.00	21.25
20 d	55.75	27.00	29.39	56.00 ^{ab}	27.58	27.50
30 d	55.53	27.94	27.75	63.62 ^b	30.34	33.75
Medium						
PDA	51.35	29.99	22.00 ^a	48.00 ^a	22.33 ^a	26.33
CYA	57.65	25.11	33.00 ^b	61.00 ^b	31.00 ^b	28.67
Strain						
A. 999	56.02	–	–	52.33	–	–
A. 983	52.98	–	–	56.67	–	–

Table 4. Mean rank of OTA/cm² and colonies diameter

^{a, b, c} Difference on the same column. Different letter corresponds to statistically significant differences.

	OTA/cm ²			Colony diameter		
	15°C	30°C	40°C	15°C	30°C	40°C
Days						
10 d	19.33	17.08	15.00	8.75 ^a	13.62 ^a	14.75
20 d	16.83	21.42	19.62	20.75 ^b	17.00 ^a	19.25
30 d	19.33	17.00	20.38	26.00 ^b	24.88 ^a	21.50
Medium						
PDA	17.50	18.00	15.50	12.50 ^a	14.00	18.00
CYA	19.50	19.00	21.50	24.50 ^b	23.00	19.00
Strain						
A. 999	23.39 ^a	19.50	15.55	14.50 ^a	13.50 ^a	23.50 ^a
A. 983	13.61 ^b	17.50	21.50	22.50 ^b	23.50 ^b	13.50 ^b

Table 5. Mean rank of OTA/cm² and colonies diameter at different temperature

^{a, b, c} Difference on the same column. Different letter corresponds to statistically significant differences.

A. 999	OTA/cm ²			Colony diameter		
	15°C	30°C	40°C	15°C	30°C	40°C
Days						
10 d	10.25	11.17	9.00	5.00 ^a	3.50 ^a	9.50
20 d	6.92	10.83	10.50	9.50 ^{ab}	10.25 ^b	9.50
30 d	11.33	6.50	9.00	14.00 ^b	14.75 ^b	9.50
Medium						
PDA	11.50	14.00 ^a	10.00	6.00 ^a	10.00	5.00 ^a
CYA	7.50	5.00 ^b	9.00	13.00 ^b	9.00	14.00 ^b

A. 983	OTA/cm ²			Colony diameter		
	15°C	30°C	40°C	15°C	30°C	40°C
Days						
10 d	11.58	6.50	6.50	3.50 ^a	10.25	6.50
20 d	10.42	11.00	10.25	11.00 ^b	6.50	9.50
30 d	6.50	11.00	11.75	14.00 ^b	11.75	12.50
Medium						
PDA	6.50 ^a	5.00 ^a	6.50 ^a	7.00	5.00 ^a	14.00 ^a
CYA	12.50 ^b	14.00 ^b	12.50 ^b	12.00	14.00 ^b	5.00 ^b

Table 6. Mean rank of OTA/cm² and colonies diameter of *A. 999* and *A. 983* grown at different temperature

^{a, b, c} Difference on the same column. Different letter corresponds to statistically significant differences.

	OTA/cm ²		Colony diameter	
	PDA	CYA	PDA	CYA
Days				
10 d	28.67	23.53	21.50	22.25
20 d	26.50	30.08	27.00	28.75
30 d	27.33	28.89	34.00	31.50
Temp.				
15°C	21.83 ^a	20.44 ^a	12.00 ^a	19.00 ^a
30°C	44.83 ^b	45.50 ^b	45.50 ^b	45.50 ^b
40°C	15.83 ^a	16.56 ^a	25.00 ^c	18.00 ^a
Strain				
A. 999	31.78 ^a	24.44	24.33	26.67
A. 983	23.22 ^b	30.56	38.87	28.33

Table 7. Mean rank of OTA/cm² and colonies diameter in various media

^{a, b, c} Difference on the same column. Different letter corresponds to statistically significant differences.

A.999	OTA/cm ²		Colony diameter	
	PDA	CYA	PDA	CYA
Days				
10 d	16.33	12.11	11.00	13.00
20 d	12.33	16.17	15.00	13.50
30 d	13.33	13.72	16.00	15.50
Temp.				
15°C	12.50 ^a	12.50 ^a	5.00 ^a	5.00 ^a
30°C	23.00 ^b	23.00 ^b	23.00 ^b	23.00 ^b
40°C	6.67 ^c	6.50 ^c	14.00 ^c	14.00 ^c
A. 983	OTA/cm ²		Colony diameter	
	PDA	CYA	PDA	CYA
Days				
10 d	13.00	11.72	11.00	10.50
20 d	15.00	14.78	12.00	14.00
30 d	14.00	15.50	19.00	17.50
Temp.				
15°C	9.50 ^a	7.83 ^a	7.00 ^a	12.00 ^a
30°C	23.00 ^b	23.00 ^b	23.00 ^b	23.00 ^b
40°C	9.50 ^a	11.17 ^a	12.00 ^a	7.00 ^a

Table 8. Mean rank of OTA/cm² and colonies diameter grown in PDA and CYA

^{a, b, c} Difference on the same column. Different letter corresponds to statistically significant differences.

3.2. 다양한 배양 환경에서 *A. 41403*의 독소 생산량 및 건조 중량

A. 41403, *A. 46471* 의 배양 결과는 Table 9-16 와 Fig. 5-6 에 나타내었다. HPLC 를 이용한 분석 결과 *A. 46471* 은 어떤 조건에서도 aflatoxin 을 생산하지 않는다는 것을 확인하였다. (data not shown)

최초 pH 가 다른 경우 AF 생산량은 온도 조건에 의해 유의한 차이가 있었으며 건조 중량의 경우에는 온도 외에도 배지에 따른 차이를 보였다.

온도 조건을 보면 30°C에서 가장 많은 AF 를 생산하였다. 15°C와 40°C간에는 생산한 AF 양과 최종 pH 에서 유의적인 차이를 보여 AF 생산량이 높은 온도부터 30°C, 15°C, 40°C 순이었으며 최종 pH는 높은 온도부터 40°C, 30°C, 15°C 순으로 분석되었다. 건조 중량의 경우에는 배지에 따른 차이를 보였는데 CYB 의 경우에는 15°C와 30°C간에는 차이가 없었으나 40°C에서 가장 높은 값을 보였다. PDB 의 경우에는 15°C, 30°C, 40°C가 각각 유의적인 차이를 보였다. AF 역시도 OTA 와 마찬가지로 40°C에서는 균체의 성장과 관계없이 AF 가 생성되지 않았거나 극미량만이 검출되었다.

기존의 연구에서 *A. flavus* 를 3 가지 종류의 배지에 접종하였을 때 30°C에서보다 35°C에서 AF 생산이 더 낮은 것으로 보고되었다[25]. 보리와 밀에서 AF 를 생산한 연구에서는 25~35°C가 최적 온도였으며 그 외의 온도에서는 AF 생산량이 급격히 감소하였다[45]. 13°C의 저온에서 *A. flavus* 를 장시간 배양 시 AFB₁ 의 생산량이 증가하였으나 41°C에서는 검출되지 않았다고 보고하였다. 또한 이 보고에서 역시 35°C를 최적의 성장 온도로 보고하였다[46]. AF 의 생산이 온도에 영향을 받는 이유에 대하여 AF 의 생산에 관여하는 유전자인 AFLR 의

발현이 28℃에서는 활발하나 37℃에서는 작동하지 않아 aflatoxin 이 생산되지 않는다고 하였다[47].

CYB 배지에서 배양한 경우 30℃에서 처음 pH 가 pH 4.0 일 때가 pH 8.0 일 때보다 적은 AF 값을 보였으며 건조 중량은 pH 4.0 와 pH 8.0 이 pH 6.0 보다 유의적으로 높았다. 몇몇 연구에서는 초기 pH 는 aflatoxin 생성에 유의적인 영향을 미치지 않거나[48] pH 5~6 의 낮은 pH 가 aflatoxin 생산의 최적 pH 라고 보고하여[19, 23] 본 연구와 다른 결과를 보였다. 그러나 sterigmatocystin 을 aflatoxin B₁ 로 전환하는 효소의 최적 pH 는 7.8 이라고 보고하여[49] 약 알칼리에서도 다량의 aflatoxin 이 생성될 수 있는 것으로 보인다.

30℃ 결과만을 보았을 때 PDB 에서 배양하였을 경우가 CYB 에서의 경우 보다 더 적은 AF 가 생산되었으며 건조 중량의 경우에는 CYB 가 PDB 보다 더 높은 결과를 보였다. *A. flavus* 는 다양한 탄소원 중 sucrose 를 포함한 배지에서 다른 당류를 포함한 배지에서 보다 높은 78mg/L 가 생성되었으며 fructose 에서는 76mg/L 가 생성되었다[50]. 또한 CYB 는 PDB 보다 높은 당 함유량을 가지는데 기존의 연구에서 배지에 함유된 sucrose 의 경우 함유량이 20%에 이를 때까지 AF 의 생산량이 지속적으로 증가한다고 보고하였다[48]. 다른 연구에서는 sucrose 가 fructose 보다 2 배 높은 AF 생산을 보였으며 CYB 에 사용된 yeast extract 를 질소원으로 사용했을 때 peptone 등의 다른 질소원보다 많은 AF 가 생산되었다[51].

따라서 본 연구에 따르면 배양 온도는 40℃에서 가장 안전하며 sucrose 의 함유량이 높은 식품에서는 곰팡이 오염에 대한 주의가 필요하다고 할 수 있다.

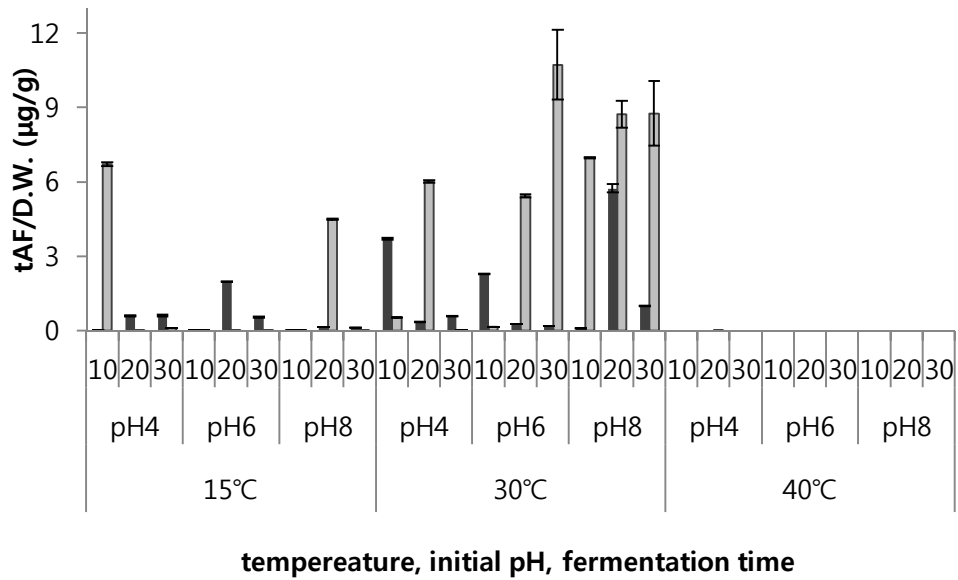


Fig. 5. Production of total AF/D.W. from different medium and different initial pH for 10, 20 and 30 days; ■ , PDB; □ , CYB

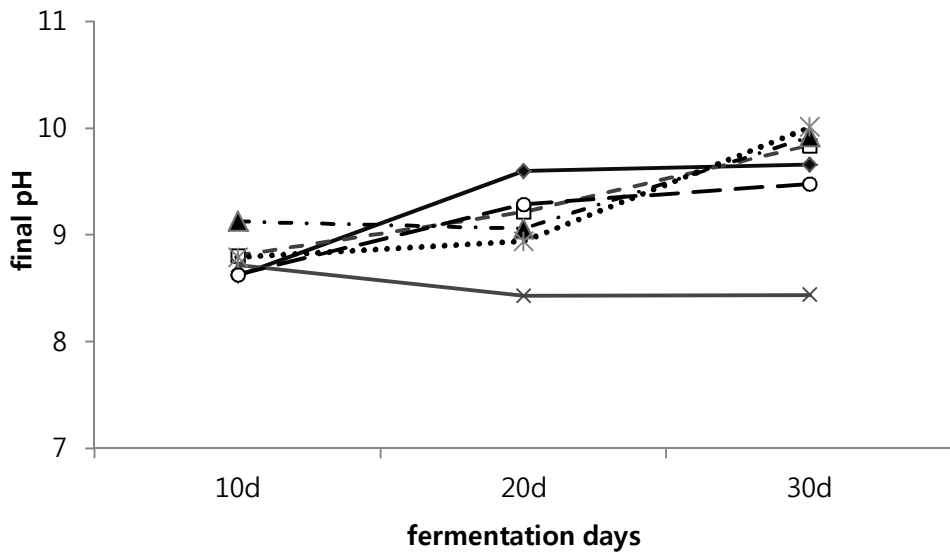


Fig. 6. Result of final pH grown under different medium and different initial pH for 10, 20 and 30 days at 40°C; ◆, PDB pH 4.0; □, PDB pH 6.0 ; ▲ , PDB pH 8.0; ×, CYB pH 4.0; ✖ , CYB pH 6.0; ○ ,CYB pH 8.0.

AF/D.W. (ng/g)		AFB ₁		AFB ₂	
pH	Days	PDB	CYB	PDB	CYB
	10 d	5.4 ±3.3	5900.5 ±71.7	0.4 ±0.7	822.2 ±51.4
pH 4.0	20 d	542.2 ±22.1	1.7 ±0.1	53.2 ±7.5	ND
	30 d	481.0 ±15.9	79.2 ±1.7	108.3 ±25.3	18.3 ±0.3
	10 d	7.9 ±1.9	7.1 ±3.1	ND	ND
pH 6.0	20 d	1388.2 ±4.9	0.3 ±0.2	575.2 ±9.5	ND
	30 d	391.1 ±17.1	0.6 ±0.1	150.0 ±13.6	ND
	10 d	4.4 ±1.1	4.1 ±1.1	ND	ND
pH 8.0	20 d	104.7 ±2.8	4262.2 ±35.6	6.8 ±2.4	231.4 ±3.6
	30 d	77.8 ±1.6	0.7 ±0.0	20.5 ±8.6	ND

Table 9. Production of aflatoxin B₁/D.W. and B₂/D.W. grown in various pH medium at 15°C by A. 41403

ND : none detected; AFB₁ <0.03 ng/ml; AFB₂ <0.05 ng/ml

AF/D.W. (ng/g)		AFB ₁		AFB ₂	
pH	Days	PDB	CYB	PDB	CYB
	10 d	3563.3 ±17.7	502.42 ±18.4	137.2 ±42.2	21.3 ±4.2
pH 4.0	20 d	321.7 ±12.4	5896.8 ±50.7	12.5 ±3.7	117.3 ±57.5
	30 d	546.9 ±2.7	5.7 ±1.0	30.5 ±6.5	0.2 ±0.2
	10 d	2163.5 ±5.1	151.1 ±1.0	112.5 ±2.1	4.0 ±2.4
pH 6.0	20 d	247.5 ±9.4	5362.1 ±59.0	3.7 ±2.7	72.4 ±4.5
	30 d	170.1 ±0.3	10576.0 ±1458.6	0.9 ±0.9	160.4 ±132.0
	10 d	78.8 ±2.7	6973.7 ±27.4	1.7 ±0.2	4.4 ±5.4
pH 8.0	20 d	5459.9 ±180.8	8729.6 ±545.9	280.3 ±13.2	2.5 ±2.6
	30 d	954.4 ±6.0	8771.3 ±1311.0	33.9 ±0.6	0.3 ±0.5

Table 10. Production of aflatoxin/D.W. by *A. 41403* produced in different media at 30°C

ND : none detected; AFB₁ <0.03 ng/ml; AFB₂ <0.05 ng/ml

AF/D.W. (ng/g)		AFB ₁		AFB ₂	
pH	Days	PDB	CYB	PDB	CYB
	10 d	0.9 ±0.4	ND	ND	ND
pH 4.0	20 d	ND	0.1 ±0.1	ND	ND
	30 d	ND	ND	ND	ND
	10 d	0.9 ±0.3	ND	ND	ND
pH 6.0	20 d	ND	ND	ND	ND
	30 d	0.2 ±0.4	ND	ND	ND
	10 d	0.1 ±0.1	ND	ND	ND
pH 8.0	20 d	0.1 ±0.2	ND	ND	ND
	30 d	ND	ND	ND	ND

Table 11. Detection of Aflatoxin B₁/D.W. and B₂/D.W. produced at 40°C by *A. 41403*

ND : none detected; AFB₁ <0.03 ng/ml; AFB₂ <0.05 ng/ml

Dry weight (mg)		15°C		30°C		40°C	
pH	Days	PDB	CYB	PDB	CYB	PDB	CYB
	10 d	42.0	132.6	97.6	236.4	119.1	272.7
pH 4.0	20 d	88.4	214.9	84.3	218.3	109.0	244.1
	30 d	92.0	248.1	83.0	211.6	107.5	227.5
	10 d	22.3	63.5	88.5	216.8	73.0	248.3
pH 6.0	20 d	37.6	227.6	91.9	205.6	98.1	204.7
	30 d	88.9	232.2	82.6	174.5	97.4	200.5
	10 d	41.1	212.0	97.1	237.1	270.6	276.3
pH 8.0	20 d	14.6	251.6	87.6	206.0	74.6	278.4
	30 d	61.4	258.9	81.0	213.8	86.1	253.3

Table 12. Dry weight of *Aspergillus* mycelium incubated at 15°C, 30°C and 40°C in different media

	tAF/D.W.	D.W.	pH
Temp.			
15 °C	91.19 ^a	67.17 ^a	27.50 ^a
30 °C	124.83 ^b	77.17 ^a	88.00 ^b
40 °C	28.48 ^c	100.17 ^b	129.00 ^c
Days			
10 d	80.46	84.00	74.92
20 d	85.89	79.33	81.17
30 d	78.15	81.17	88.42
Medium			
PDB	82.93	45.89 ^a	84.22
CYB	80.07	117.11 ^b	78.78
pH			
4.0	83.04	87.50	79.08
6.0	76.63	69.17	84.67
8.0	82.83	87.83	80.75

Table 13. Mean rank of tAF/D.W., final pH and dry weight

^{a, b, c} Difference on the same column. Different letter corresponds to statistically significant differences.

	tAF/D.W.		D.W.	
	PDB	CYB	PDB	CYB
Temp.				
15 °C	48.15 ^a	44.11 ^a	23.00 ^a	39.00 ^a
30 °C	60.85 ^b	64.81 ^b	43.00 ^b	30.33 ^a
40 °C	14.00 ^c	14.07 ^c	57.00 ^c	53.67 ^b
pH				
4.0	43.33	41.22	52.00 ^a	42.00 ^a
6.0	42.28	37.67	38.00 ^b	26.67 ^b
8.0	37.39	44.11	33.00 ^b	54.33 ^a
Days				
10 d	38.44	41.52	42.00	42.67
20 d	43.67	41.81	38.67	40.67
30 d	40.89	39.67	42.33	39.67

Table 14. Mean rank of tAF/D.W. and dry weight in PDB and CYB media

^{a, b, c} Difference on the same column. Different letter corresponds to statistically significant differences.

	tAF/D.W			D.W.		
	15°C	30°C	40°C	15°C	30°C	40°C
Days						
10 d	25.50	23.00	32.94 ^a	19.50 ^a	35.50 ^a	34.00
20 d	31.28	32.22	26.00 ^a	27.00 ^{ab}	26.50 ^{ab}	26.00
30 d	25.72	27.28	23.56 ^a	36.00 ^b	20.50 ^b	22.50
Medium						
PDB	32.96 ^a	21.67 ^a	31.26 ^a	15.00 ^a	14.00 ^a	16.00 ^a
CYB	22.04 ^b	33.33 ^b	23.74 ^b	40.00 ^b	41.00 ^b	39.00 ^b
pH						
4.0	33.00	22.50 ^a	29.44	30.50	30.00	29.00 ^a
6.0	23.28	24.83 ^{ab}	28.44	24.00	24.50	20.00 ^a
8.0	26.22	35.17 ^b	24.61	28.00	28.00	33.50 ^a

Table 15. Mean rank of tAF/ D.W. and dry weight at 15°C, 30°C and 40°C

^{a, b, c} Difference on the same column. Different letter corresponds to statistically significant differences.

PDB	tAF/D.W			D.W.		
	15°C	30°C	40°C	15°C	30°C	40°C
Days						
10 d	5.00 ^a	15.00 ^a	20.33 ^a	10.00 ^a	22.00	17.00
20 d	20.56 ^b	15.00 ^b	10.67 ^b	10.00 ^a	15.00	13.00
30 d	16.44 ^b	12.00 ^c	11.00 ^b	22.00 ^b	5.00	12.00
pH						
4.0	15.67	16.00	14.33	20.00 ^a	15.00	20.00 ^a
6.0	16.89	11.00	15.94	12.00 ^{ab}	14.00	9.00 ^b
8.0	9.44	15.00	11.72	10.00 ^b	13.00	13.00 ^{ab}
CYB	tAF/D.W			D.W.		
	15°C	30°C	40°C	15°C	30°C	40°C
Days						
10 d	19.00	10.00	13.00	5.00 ^a	22.00	19.00 ^a
20 d	12.00	15.44	16.00	16.00 ^b	11.00	14.00 ^{ab}
30 d	11.00	16.56	13.00	21.00 ^b	9.00	9.00 ^b
pH						
4.0	19.00 ^a	8.00 ^a	16.00	12.00	18.00 ^a	13.00 ^a
6.0	8.00 ^b	13.67 ^{ab}	13.00	11.00	8.00 ^b	7.00 ^a
8.0	15.00 ^{ab}	20.33 ^b	13.00	19.00	16.00 ^{ab}	22.00 ^b

Table 16. Mean rank of tAF/ D.W. and dry weight at 15°C, 30°C and 40°C in different media

^{a, b, c} Difference on the same column. Different letter corresponds to statistically significant differences.

3.2. A. 41403과 경쟁 균주의 공동 배양

A. 41403을 LAB 및 *S. cerevisiae*와 공동 배양하였다. 결과는 Table 17-19와 Fig. 7-8에 나타내었다. 총 23종의 균주 중 20종에서 AF의 생산이 저해되었으며 23종의 균주 모두 A. 41403을 단독 배양하였을 때보다 곰팡이의 성장이 저해되었다. AF의 생산을 증가시킨 3종의 균주를 제외했을 때 LAB의 평균 저해율은 92.2%로 평균 7.6 ± 12.0 ng/ml의 tAF를 생산하였으며 건조 중량 당으로 계산하였을 때는 1138.1 ± 1294.0 ng/g이었다. *S. cerevisiae* 균주들은 0.1 ± 0.0 ng/ml의 tAF가 검출되었으며 1 g의 건조 중량 당 1.1 ± 0.8 ng의 tAF가 생산되었다. LAB 균주 중에서는 *L. brevis* 균주들이 유의적으로 낮은 건조 중량값을 보여 반대로 건조 중량 당의 생산량은 가장 높게 나타났다. *L. brevis* 3 균주 모두 건조 중량이 0.0 ± 0.0 mg으로 A. 41403을 성장하지 못하게 하여 AF이 생산되지 못한 것으로 볼 수 있다.

기존의 연구에서 *A. nidulans*와 *L. plantarum*을 공동 배양하였을 때 균사의 성장이 저해됨과 동시에 형태에도 변화가 있었는데 이 연구에서는 64%의 성장이 저해되었다[52]. *A. flavus*를 *L. casei*와 공동 배양한 연구에서는 99.2%의 AF 생산량이 감소했으며 28.7%의 건조 중량 감소량을 보였다[36]. 또한 *S. cerevisiae*를 *A. flavus*와 닭 먹이에서 공동 배양하였을 때 AF 오염의 위험을 줄일 수 있다고 하였다[53]. *S. cerevisiae*와 공동 배양하였을 때 LAB와 공동 배양한 경우 10일간의 배양 후 평균 pH 6.7 ± 2.0 으로 A. 41403을 단독 배양한 pH 8.33보다 상대적으로 낮거나 차이가 없었으나 *S. cerevisiae*의 경우에는 pH 9.0 ± 0.2 로 A. 41403 단독 배양한

경우보다도 높은 pH 결과를 보였다.

따라서 본 연구에 따르면 곰팡이의 생장을 고려하지 않는다면 *S. cerevisiae* KCTC 7904 균주가 가장 우수한 AF 억제력을 가지고 있으며 곰팡이를 같이 배양해야 하는 경우에는 *L. acidophilus* KCTC 3142 균주가 적합하다고 할 수 있다.

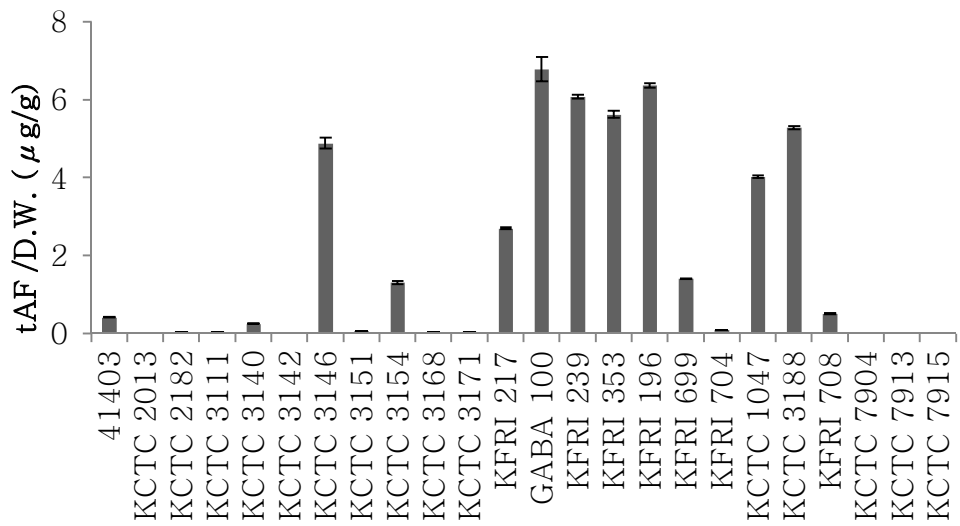


Fig. 7. Result of tAF/D.W. produced by A. 41403 grown in MRS media

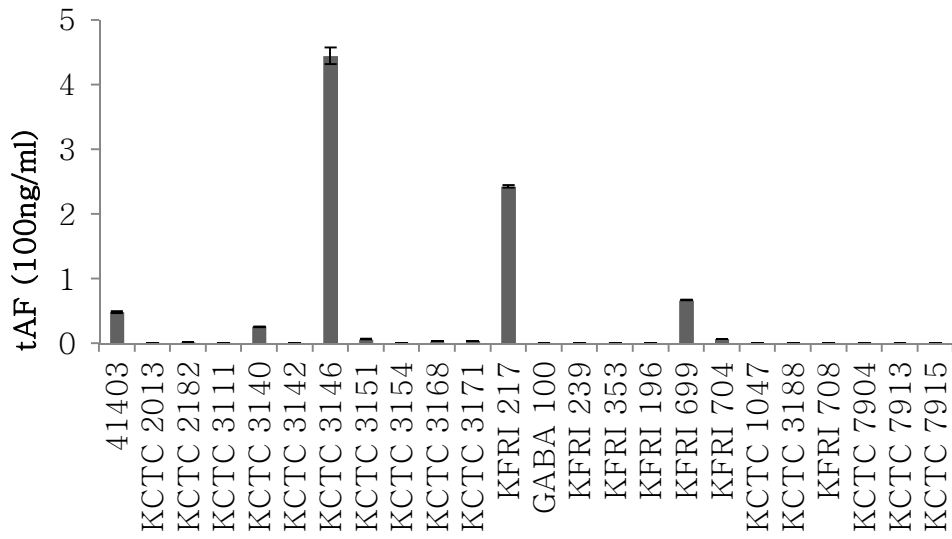


Fig. 8. Result of tAF produced by *Aspergillus* during coculture with *Lactobacillus* sp. and yeasts in MRS broth

Strains	CFU (log ₁₀)	pH ¹⁾	D.W. (mg)	AFB ₁ (ng/ml)	AFB ₂ (ng/ml)	tAF/D.W. (ng/g)
A. 41403	–	8.33	236.1	93.4 ±0.3	4.0 ±0.3	412.6 ±12.3
<i>L. lactis</i> KCTC 2013	7.4 ±0.2	7.96	122.2	2.0 ±0.0	0.0 ±0.0	16.0 ±0.3
<i>L. acido.</i> ²⁾ KCTC 2182	8.6 ±0.0	8.14	97.4	4.5 ±0.1	0.0 ±0.0	46.3 ±0.8
<i>L. acido.</i> KCTC 3111	7.1 ±0.3	7.83	79.5	3.1 ±0.1	0.0 ±0.0	38.6 ±0.7
<i>L. acido.</i> KCTC 3140	< 2	8.28	209.3	49.5 ±0.8	2.2 ±0.1	246.2 ±4.3
<i>L. acido.</i> KCTC 3142	< 2	8.13	200.4	1.0 0.1	0.0 ±0.0	5.1 ±0.3
<i>L. acido.</i> KCTC 3146	3.2 ±0.1	8.15	182.1	881.5 ±26.3	7.5 ±0.7	4881.4 ±141.7
<i>L. acido.</i> KCTC 3151	< 2	8.41	219.3	13.4 ±1.1	0.0 ±0.0	61.1 ±4.8
<i>L. acido.</i> KCTC 3154	7.6 ±0.1	3.82	2.3	2.9 ±0.1	0.0 ±0.0	1304.7 ±41.5
<i>L. acido.</i> KCTC 3168	< 2	8.08	188.0	6.1 ±0.0	0.0 ±0.0	32.5 ±0.1
<i>L. acido.</i> KCTC 3171	< 2	8.2	194.7	8.3 ±0.2	0.2 ±0.0	43.6 ±0.7
<i>L. acido.</i> KFRI 217	5.5 ±0.3	8.07	180.3	477.9 ±5.2	7.7 ±1.0	2693.1 ±25.2
<i>L. brevis</i> GABA 100	7.5 ±0.2	4.16	0.0	3.4 ±0.2	0.0 ±0.0	6783.2 ±310.7

<i>L. brevis</i> KFRI 239	7.7 ±0.2	4.49	0.0	3.0 ±0.0	0.0 ±0.0	6075.9 ±44.5
<i>L. brevis</i> KFRI 353	7.8 ±0.1	4.43	0.0	2.8 ±0.0	0.0 ±0.0	5624.5 ±93.8
<i>L. casei</i> KFRI 196	8.0 ±0.1	4.37	0.0	3.2 ±0.0	0.0 ±0.0	6369.8 ±55.0
<i>L. casei</i> KFRI 699	7.8 ±0.1	7.92	95.4	127.9 ±1.1	6.0 ±0.0	1404.6 ±11.2
<i>L. casei</i> KFRI 704	6.7 ±0.3	7.89	163.9	15.2 ±0.0	0.2 ±0.1	93.9 ±0.9
<i>L. delbru.</i> ³⁾ KCTC 1047	4.8 ±0.0	4.65	0.7	2.7 ±0.0	0.0 ±0.0	2019.3 ±27.4
<i>L. bulga.</i> ⁴⁾ KCTC 3188	< 2	4.35	0.6	3.1 ±0.0	0.0 ±0.0	5279.8 ±40.3
<i>L. plant.</i> ⁵⁾ KFRI 708	< 2	4.04	5.2	2.6 ±0.1	0.0 ±0.0	501.8 ±10.5
<i>S. cerev.</i> ⁶⁾ KCTC 7904	< 2	9.17	45.9	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	0.9 ±0.1
<i>S. cerev.</i> KCTC 7913	5.5 ±0.2	8.83	12.8	0.1 ±0.0	0.0 ±0.0	4.1 ±0.4
<i>S. cerev.</i> KCTC 7915	< 2	9.01	35.5	0.1 ±0.0	0.0 ±0.0	1.7 ±0.1

Table. 17. Results of cell number, pH, dry weight, AFB₁, AFB₂, and tAF/D.W. cocultured with *Lactobacillus* sp. and *S. cerevisiae*

¹⁾Initial pH : 6.33

²⁾ *L. acidophilus*, ³⁾ *L. delbrueckii*, ⁴⁾ *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, ⁵⁾ *L. plantarum*, ⁶⁾ *S. cerevisiae*

	<i>L. acido.</i> ¹⁾	<i>L. casei</i>	<i>L. brevis</i>	<i>L. delbr</i> ²⁾	<i>L. lactis</i>	<i>L. plant.</i> ³⁾	<i>S. cerev.</i> ⁴⁾
CFU (log10)	10.00	18.33	19.33	8.00	14.00	5.00	
pH*	14.3	8.67	5.33	6.00	12.00	2.00	
D.W.	17.3 ^a	10.50 ^a	2.50 ^b	5.50 ^a	15.00 ^a	8.00 ^a	
tAF*	15.75	18.00	10.67	9.25	5.00	6.00	
tAF/D.W.*	10.40 ^a	16.00 ^{ab}	21.33 ^b	18.00 ^{ab}	5.00 ^{ab}	13.00 ^{ab}	
CFU (log10)							9.00
pH*							23.00
D.W.							10.00
tAF*							2.00
tAF/D.W.*							2.00

Table. 18. Mean rank of cell number, pH, dry weight, tAF and tAF/D.W..

¹⁾ *L. acidophilus*, ²⁾ *L. delbrueckii*, ³⁾ *L. plantarum*

⁴⁾ *S. cerevisiae*

^{a, b} Difference on the same line. Different letter corresponds to statistically significant differences.

* factors having statistical differences between LAB and *S. cerevisiae* (p < 0.05)

	<i>L. acido.</i> ¹⁾	<i>L. casei</i>	<i>L. brevis</i>	<i>L. delbr.</i> ²⁾	<i>L. lactis</i>	<i>L. plant.</i> ³⁾	<i>S. cere.</i> ⁴⁾
CFU (log10)	5.1 ±4.1	5.5 ±0.9	5.7 ±0.2	4.5 ±3.4	7.4	0.0	5.1 ±3.2
pH*	7.6 ±1.5	6.1 2.5	4.4 ±0.2	4.5 ±0.2	8.0	4.0	9.0 ±0.2
pH change 5)	-0.6 ±1.4	-1.6 ±2.0	-4.0 ±0.2	-3.8 ±0.2	-0.4	-4.29	0.7 ±0.2
D.W. (mg)	148.8 ±79.1	86.4 ±82.3	0.0 ±0.0	0.6 ±0.1	122.2 ±0.6	5.2 ±0.2	31.4 ±16.9
tAF* (ng/ml)	146.6 ± 300.7	50.1 ±72.2	3.1 ±0.3	2.9 ±0.3	2.0	2.6	0.1 ±0.1
tAF /D.W. (ng/g)	935.4 ± 1636.6	2622.8 ± 3310.5	6161.2 ± 584.0	4649.5 ± 891.3	16.0 ±0.3	501.8 ±10.5	2.2 ±1.7

Table. 19. Average of CFU, pH, pH change, dry weight, tAF and tAF/D.W.

¹⁾ *L. acidophilus*, ²⁾ *L. delbrueckii*, ³⁾ *L. plantarum*, ⁴⁾ *S. cerevisiae*

⁵⁾ samples final pH – A. 41403 sample final pH

4. 요약 및 결론

본 연구에서는 *A. 999*, *A. 983*, *A. 41403*, *A. 46471* 을 이용하여 *Aspergillus* sp.를 다양한 조건에서 배양하여 OTA 와 AF 의 오염 위험을 낮출 수 있는 조건에 대해 분석하였으며 경쟁 균주와의 공동배양을 통해 AF 의 생산 억제에 대해 연구하였다. *A. 46471* 은 aflatoxin 을 생산하지 않는 것으로 나타났다. 연구 결과 곰팡이 독소 생산에 공통적으로 영향을 미치는 요인은 온도였으며 30℃에서 가장 많은 곰팡이 독소가 생산되었다. OTA 의 생산에서는 균주에 따라 영향을 받는 요인이 다르게 나타났다. *A. 983* 는 *A. 999* 보다 15℃에서의 OTA 생산량이 높은 결과를 보였다. 또한 *A. 983* 은 PDA 에서 유의적으로 적은 양의 OTA 를 생산하였으며 *A. 999* 는 CYA 에서 적은 OTA 를 생산하여 두 균주 간에 차이를 보였다. *A. 41403* 의 경우에는 15℃에서 배양했을 때 40℃에서 보다 AFB₁ 높은 생산량을 보였다. 40℃에서는 독소 종류 및 균주의 성장과 관계없이 극미량만이 생성되었다. LAB 와 *S. cerevisiae* 와의 공동배양에서는 86%의 균주에서 AF 의 생산이 억제되었으며 특히 *S. cerevisiae* 는 공동 배양했을 때 99% 이상의 저해능을 보였다. 모든 균주에서 *A. 41403* 의 생장이 억제되었다. 가장 높은 AF 저해능을 보인 것은 *S. cerevisiae* KCTC 7904 이며 *L. acidophilus* KCTC 3142 균주는 곰팡이가 성장하면서도 높은 AF 억제 결과를 보였다. 결론적으로, AF 와 OTA 생산은 공통적으로 온도에 의한 영향을 크게 받아 30℃가 가장 위험하며 40℃가 가장 안전하였다. 또한 LAB 와 *S. cerevisiae* 는 AF 의 생산과 곰팡이의 성장을 억제하는 능력이 있다고 할 수 있다. 본

연구의 결과는 곱팡이 독소의 저감화 기술 개발의 기초 자료로서 활용하며 공동 배양 시 균주 선택에 참고 자료가 될 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

1. Richard, J.L., *Some major mycotoxins and their mycotoxicoses—An overview*. Int. J. Food Microbiol., 2007. **119**(1): p. 3-10.
2. Turner, N.W., Bramhmbhatt, H., Szabo-Vezse, M., Poma, A., Coker, R., and Piletsky, S.A., *Analytical methods for determination of mycotoxins: An update (2009–2014)*. Anal. Chim. Acta, 2015.
3. Lewis, L., Onsongo, M., Njapau, H., Schurz-Rogers, H., Lubber, G., Kieszak, S., Nyamongo, J., Backer, L., Dahiye, A.M., and Misore, A., *Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in eastern and central Kenya*. Environ. Health Perspect., 2005. **113**(12): p. 1763-1767.
4. Dorner, J.W., Cole, R.J., and Blankenship, P.D., *Effect of inoculum rate of biological control agents on preharvest aflatoxin contamination of peanuts*. Biol. Control, 1998. **12**(3): p. 171-176.
5. Bandyopadhyay, R., Kumar, M., and Leslie, J.F., *Relative severity of aflatoxin contamination of cereal crops in West Africa*. Food Addit. Contam., 2007. **24**(10): p. 1109-1114.
6. Erdogan, A., *The aflatoxin contamination of some pepper types sold in Turkey*. Chemosphere, 2004. **56**(4): p. 321-325.
7. Varga, J., Kiss, R., Mátrai, T., Mátrai, T., and Téren, J., *Detection of ochratoxin A in Hungarian wines and beers*. Acta Alimentaria, 2005. **34**(4): p. 381-392.
8. Lee, J.G., Kang, Y.W., Jeong, J.H., Noh, M.J., Ahn, E.S., Lee, K.H., and Kim, M.H., *Monitoring of ochratoxin in alcoholic beverages*. Korean J. Food Sci. Tech., 2012. **44**(2): p. 235-239.
9. Pardo, E., Marin, S., Ramos, A., and Sanchis, V., *Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in green coffee from different origins*. Food Sci. Technol. Int., 2004. **10**(1): p. 45-49.
10. Nguyen, K.T.N. and Ryu, D., *Concentration of ochratoxin A in breakfast cereals and snacks consumed in the United States*. Food Control, 2014. **40**: p. 140-144.
11. Kurtzman, C., Horn, B., and Hesseltine, C., *Aspergillus nomius, a new aflatoxin-producing species related to Aspergillus flavus and Aspergillus*

- tamarii*. Antonie van Leeuwenhoek, 1987. **53**(3): p. 147-158.
12. Peterson, S.W., Ito, Y., Horn, B.W., and Goto, T., *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. Mycologia, 2001. **93**(4): p. 689-703.
 13. Samson, R.A., Houbroken, J., Kuijpers, A.F., Frank, J.M., and Frisvad, J.C., *New ochratoxin A or sclerotium producing species in Aspergillus section Nigri*. Stud. Mycol., 2004. **50**(1): p. 45-61.
 14. Pitt, J.I., *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, and production of ochratoxin A. Appl. Environ. Microbiol., 1987. **53**(2): p. 266-269.
 15. Xiao, H., Marquardt, R.R., Abramson, D., and Frohlich, A.A., *Metabolites of ochratoxins in rat urine and in a culture of Aspergillus ochraceus*. Appl. Environ. Microbiol., 1996. **62**(2): p. 648-655.
 16. Téren, J., Varga, J., Hamari, Z., Rinyu, E., and Kevei, F., *Immunochemical detection of ochratoxin A in black Aspergillus strains*. Mycopathologia, 1996. **134**(3): p. 171-176.
 17. Ono, H., Kataoka, A., Koakutsu, M., Tanaka, K., Kawasugi, S., Wakazawa, M., Ueno, Y., and Manabe, M., *Ochratoxin A producibility by strains of Aspergillus niger group stored in IFO culture collection*. Mycotoxins, 1995. **41**: p. 47-51.
 18. Groopman, J.D., Donahue, P.R., Zhu, J., Chen, J., and Wogan, G.N., *Aflatoxin metabolism in humans: detection of metabolites and nucleic acid adducts in urine by affinity chromatography*. Pro. Natl. Acad. Sci. U. S. A. , 1985. **82**(19): p. 6492-6496.
 19. Buchanan, R.L. and Ayres, J.C., *Effect on initial pH on aflatoxin production*. Appl. Microbiol., 1976. **30**(6): p. 1050-1051.
 20. Bueno, D., Istamboulie, G., Muñoz, R., and Marty, J.L., *Determination of mycotoxins in food: a review of bioanalytical to analytical methods*. Appl. Spectros. Reviews, 2015. **50**(9): p. 728-774.
 21. MFDS, *Korean Foods Code*. 2015, Ministry of Food and drug safety: Cheongju, Korea
 22. Mitchell, D., Parra, R., Aldred, D., and Magan, N., *Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by Aspergillus carbonarius strains from grapes in Europe and Israel*. J. Appl. Microbiol., 2004. **97**(2): p. 439-445.

23. Holmquist, G.U., Walker, H.W., and Stahr, H.M., *Influence of temperature, pH, water activity and antifungal agents on growth of Aspergillus flavus and A. parasiticus*. J. Food Sci., 1983. **48**(3): p. 778–782.
24. Gqaleni, N., Smith, J.E., Lacey, J., and Gettinby, G., *Effects of temperature, water activity, and incubation time on production of aflatoxins and cyclopiazonic acid by an isolate of Aspergillus flavus in surface agar culture*. Appl. Environ. Microbiol., 1997. **63**(3): p. 1048-1053.
25. Kheiralla, Z.H., Hassanin, N.I., and Amra, H., *Effect of incubation time, temperature and substrate on growth and aflatoxin production*. Int. Biodeter. & Biodegrad., 1992. **30**(1): p. 17-27.
26. Astoreca, A., Barberis, C., Magnoli, C., Combina, M., and Dalcero, A., *Influence of ecophysiological factors on growth, lag phase and ochratoxin A production by Aspergillus niger aggregate strains in irradiated corn grains*. Int. J. Food Microbiol., 2009. **129**(2): p. 174-179.
27. Alborch, L., Bragulat, M.R., Abarca, M.L., and Cabañes, F.J., *Effect of water activity, temperature and incubation time on growth and ochratoxin A production by Aspergillus niger and Aspergillus carbonarius on maize kernels*. Int. J. Food Microbiol., 2011. **147**(1): p. 53-57.
28. Laitila, A., Alakomi, H.L., Raaska, L., Mattila-Sandholm, T., and Haikara, A., *Antifungal activities of two Lactobacillus plantarum strains against Fusarium moulds in vitro and in malting of barley*. J. Appl. Microbiol., 2002. **93**(4): p. 566-576.
29. Wu, Q., Jezkova, A., Yuan, Z., Pavlikova, L., Dohnal, V., and Kuca, K., *Biological degradation of aflatoxins*. Drug Metab. Rev., 2009. **41**(1): p. 1-7.
30. Gourama, H. and Bullerman, L.B., *Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus: Aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds: A review*. J. Food Prot., 1995. **58**(12): p. 1395-1404.
31. Zhang, T., Shi, Z.-Q., Hu, L.-B., Cheng, L.-G., and Wang, F., *Antifungal compounds from Bacillus subtilis B-FS06 inhibiting the growth of Aspergillus flavus*. World J. Microbiol. Biotechnol., 2008. **24**(6): p. 783-788.
32. Choudhary, A., *Influence of microbial co-inhabitants on aflatoxin synthesis of Aspergillus flavus on maize kernels*. Lett. Appl. Microbiol.,

1992. **14**(4): p. 143-147.
33. Magnusson, J., *Antifungal activity of lactic acid bacteria*. 2003, Swedish University of Agricultural Sciences: Uppsala, Sweden. p. 38.
 34. Shetty, P.H. and Jespersen, L., *Saccharomyces cerevisiae and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents*. Trends Food Sci. Technol., 2006. **17**(2): p. 48-55.
 35. Dalié, D.K.D., Deschamps, A.M., and Richard-Forget, F., *Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review*. Food Control, 2010. **21**(4): p. 370-380.
 36. Chang, I. and Kim, J.-D., *Inhibition of Aflatoxin Production of Aspergillus flavus by Lactobacillus casei*. Mycobiology, 2007. **35**(2): p. 76-81.
 37. Jermnak, U., Chinaphuti, A., Poapolathep, A., Kawai, R., Nagasawa, H., and Sakuda, S., *Prevention of aflatoxin contamination by a soil bacterium of Stenotrophomonas sp. that produces aflatoxin production inhibitors*. Microbiology, 2013. **159**(5): p. 902-912.
 38. da Rocha, M.E.B., Freire, F.d.C.O., Maia, F.E.F., Guedes, M.I.F., and Rondina, D., *Mycotoxins and their effects on human and animal health*. Food Control, 2014. **36**(1): p. 159-165.
 39. Kim, N.Y., Lee, I., and Ji, G.E., *Reliable and simple detection of ochratoxin and fumonisin production in black Aspergillus*. J. Food Prot., 2014. **77**(4): p. 653-658.
 40. Kim, N.Y., Lee, J.H., Lee, I., and Ji, G.E., *An evaluation of aflatoxin and cyclopiazonic acid production in Aspergillus oryzae*. J. Food Prot., 2014. **77**(6): p. 1010-1016.
 41. Kwon, J.Y., Jeong, H.W., Kim, H.K., Kang, K.H., Chang, Y.H., Bae, K.S., Choi, J.D., Lee, U.C., Son, K.H., and Kwon, B.M., *cis-fumagillin, a new methionine aminopeptidase (type 2) inhibitor produced by Penicillium sp. F2757*. J. Antibiot., 2000. **53**(8): p. 799-806.
 42. Entwisle, A.C., Williams, A.C., Mann, P.J., Slack, P.T., and Gilbert, J., *Liquid chromatographic method with immunoaffinity column cleanup for determination of ochratoxin A in barley: collaborative study*. J. AOAC Int., 2000. **83**(6): p. 1377-1383.
 43. Esteban, A., Abarca, M.L., Bragulat, M.R., and Cabañes, F.J., *Effects of temperature and incubation time on production of ochratoxin A by*

- black aspergilli*. Res. Microbiol., 2004. **155**(10): p. 861-866.
44. Medina, Á., Mateo, E.M., Valle-Algarra, F.M., Mateo, F., Mateo, R., and Jiménez, M., *Influence of nitrogen and carbon sources on the production of ochratoxin A by ochratoxigenic strains of Aspergillus spp. isolated from grapes*. Int. J. Food Microbiol., 2008. **122**(1): p. 93-99.
 45. Niles, E.V., Norman, J.A., and Pimbley, D., *Growth and aflatoxin production of Aspergillus flavus in wheat and barley*. Trans. Br. Mycol. Soc., 1985. **84**(2): p. 259-266.
 46. Schindler, A.F., Palmer, J.G., and Eisenberg, W.V., *Aflatoxin production by Aspergillus flavus as related to various temperatures*. Appl. Microbiol., 1967. **15**(5): p. 1006-1009.
 47. O'Brien, G.R., Georgianna, D.R., Wilkinson, J.R., Yu, J., Abbas, H.K., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Nierman, W., and Payne, G.A., *The effect of elevated temperature on gene transcription and aflatoxin biosynthesis*. Mycologia, 2007. **99**(2): p. 232-239.
 48. Davis, N.D., Diener, U., and Eldridge, D., *Production of aflatoxins B1 and G1 by Aspergillus flavus in a semisynthetic medium*. Appl. Microbiol., 1966. **14**(3): p. 378-380.
 49. Singh, R. and Hsieh, D., *Enzymatic conversion of sterigmatocystin into aflatoxin B1 by cell-free extracts of Aspergillus parasiticus*. Appl. Environ. Microbiol., 1976. **31**(5): p. 743-745.
 50. Mateles, R. and Adye, J., *Production of aflatoxins in submerged culture*. Appl. Microbiol., 1965. **13**(2): p. 208-211.
 51. Davis, N., Diener, U., and Agnihotri, V., *Production of aflatoxins B1 and G1 in chemically defined medium*. Mycopathol. Mycol. Appl., 1967. **31**(3-4): p. 251-256.
 52. Ström, K., Schnürer, J., and Melin, P., *Co-cultivation of antifungal Lactobacillus plantarum MiLAB 393 and Aspergillus nidulans, evaluation of effects on fungal growth and protein expression*. FEMS Microbiol. Lett., 2005. **246**(1): p. 119-124.
 53. Kusumaningtyas, E., Widiastuti, R., and Maryam, R., *Reduction of aflatoxin B1 in chicken feed by using Saccharomyces cerevisiae, Rhizopus oligosporus and their combination*. Mycopathologia, 2006. **162**(4): p. 307-311.

Abstract

Effect of Culture Conditions on Mycotoxin Production and Inhibition of Mycotoxin by Coculture

Lee Yuna

Department of Food & Nutrition

The Graduate School

Seoul National University

Ochratoxin A and aflatoxin may be detected from naturally fermented foods due to the contamination of the mycotoxin-producing molds or un-prudential use of the mycotoxin producing starter strains during the fermentation. This study was carried out to analyze the production of ochratoxin A and aflatoxin, and inhibition of aflatoxin by coculture with LAB and *S. cerevisiae*.

For the experiment, the effect of different temperature, culture media, and fermentation time on the production of ochratoxin A by *Aspergillus usamii* FMB S999 and *A. awamori* FMB S983. Additionally, the production of aflatoxin was assessed under the various temperature, initial pH, fermentation time and culture media during fermentation time by *A. flavus* FMB S41403 and *A. oryzae* FMB S46471.

The levels of ochratoxin A and aflatoxin were analyzed by HPLC. The result showed that the production of mycotoxin and colony diameter was greatly affected by the fermentation temperature. *A. oryzae* FMB S46471 did not produce aflatoxin. All of the mycotoxin producing strains showed the highest level of mycotoxin at 30°C. Although the experimented *Aspergillus* grew well, they did not produce mycotoxin at 40°C. *A. usamii* FMB S999 showed low level of ochratoxin A in CYA media in 30°C. However, *A. awamori* FMB S983 produced lower level of ochratoxin A in PDA media than CYA media in 30°C.

Lactobacillus sp. and *S. cerevisiae* were show to inhibit the growth and aflatoxin production of *A.* 41403. *S. cerevisiae* had a better inhibition ability then LAB. This study showed that the most proper strains were *S. cerevisiae* KCTC 7904 and *L. acidophilus* KCTC 3142.

The results of the present study may be useful for the reduction of ochratoxin A and aflatoxin in various foods and reference for selecting coculture strains.

Key words: Ochratoxin A, Aflatoxin, *Aspergillus*, coculture, *Lactobacillus* sp, *Saccharomyces cerevisiae*

Student number: 2014–20359