

Establishment of Optimal Production Conditions of Transglucosidase Produced by *Aspergillus niger*

Jun-Yeob Lee^{1,2}, Seongho Gang¹, Jong-Sik Kim¹ and Chungwook Chung^{1*}

¹Department of Biological Sciences, Andong National University, Andong 36729, Korea

²Department of R&D, Nensys Pharmaceutical Co., Ltd., Suwon 16574, Korea

Received June 9, 2018 / Revised August 1, 2018 / Accepted August 2, 2018

In this study, transglucosidase (TG), an enzyme produced by *Aspergillus niger*, synthesized isomaltooligosaccharide from α -(1 \rightarrow 4) linked substrates. The highest TG-producing *A. niger* KCTC6913 was selected from six kinds of species, and optimized TG producing conditions were established. Five different carbon sources (potato starch, sweet potato starch, corn starch, wheat starch, and dextrin) and three different nitrogen sources (yeast extract, malt extract, and beef extract) were tested to establish the carbon and nitrogen sources favorable for TG production. Measurements of TG activity after an initial culture at pH 5.0 for 15 days revealed that potato starch and yeast extract, which are basic culture media, resulted in the highest TG activity. In addition, *A. niger* KCTC6913 increased TG production under aerobic conditions and a controlled carbon/nitrogen ratio. In conclusion, to evaluate TG activity in the established optimal medium, it is confirmed that the basal and potato dextrose broth medium were used as a control, and the highest TG production was measured, which was highlighted in the established optimal medium.

Key words : *Aspergillus niger*, optimal production condition, transglucosidase

서 론

오늘날 고 열량, 고 단백, 고 지방과 같은 서구화 된 식습관과, 운동부족, 스트레스 등 환경적 요인이 크게 작용하여 당뇨병이 전 세계적으로 증가하고 있다. 보건복지부에서 2016년에 발표한 통계에 따르면 국내의 30세 이상 인구 중 당뇨병 유병자는 2001년 8.6%에서 2014년 10.2%로 지난 10년 간 1.6% 증가했으며, 특히 남성은 동일한 기간에 9.5%에서 12.6%로 3.1% 증가했고, 당뇨병의 위험인자인 비만은 33.6%에서 39.4%로 5.8% 증가했다. 당뇨병은 1형 당뇨병인 췌장의 β 세포 감소에 의해 인슐린 작용 저하로 나타나는 경우와 인슐린 작용 저하와 인슐린 저항성이 특징인 제 2형 당뇨병으로 나뉘며, 혈중 포도당의 농도가 높아져 지속될 때 유발 된다[13]. 한편, 당뇨병은 꾸준한 혈당관리가 필수적이거나 현재까지 근원적으로 치료할 수 있는 방법이 개발되어 있지 않고 있어, 혈당을 정상수준으로 유지하도록 하는 것이 최선의 치료 방법으로 알려져 있다. 하지만 현재 당뇨의 치료를 위해 사용되는 경구용 혈당 강하제는 저혈당, 오심, 구토, 체중증가, 소화불량 이외에도 젖산 축적의

위험성, 간 독성, 신부전증상의 악화 등의 여러 가지 형태의 부작용이 동반 될 수 있어 근원적인 치료에 한계가 있다[2, 6]. 특히 약물 요법은 설사와 복통 등의 부작용을 유발 하여 최근에는 다양한 생리활성을 갖고 있는 기능성 건강식품을 소재로 한 당뇨병 예방 및 치료제로서의 가능성에 대한 연구들이 활발히 진행되고 있다[14-16, 22]. 이러한 연구를 통해 현재 인체에 대해 안전성 및 효능이 확인된 기능성 건강식품 등이 개발되어 건강에 도움을 주던 의료품들을 대체 하고 있으며[10, 17, 19], 이 중 특히, *in vitro* 및 *in vivo* 연구를 통하여 *Aspergillus niger*에서 유래 된 transglucosidase (TG)가 혈청지질[9]과 혈당 수준[7, 21, 27] 및 체중 감소효과가 있는 것으로 확인되었다[32].

*A. niger*는 토양에 널리 퍼져있는 사상균으로 식품 미생물학 분야에서 가장 중요한 미생물 중 하나로서, 시트르산 및 글루콘산 등 다양한 유기산 생산[23]과 함께 단백질, 탄수화물 그리고 지방 분해효소 등 많은 효소[24]를 생산하기 위해 수십년 동안 사용 되어 왔으며, 한국 전통 식품 가운데 된장, 간장의 발효에 이용되는 등 전통 식품분야에서 검정곰팡이, 흑국균으로 칭해지며 generally recognized as safe, 즉 GRAS의 성질을 가진 것으로 알려져 있다.

TG는 α -glucosidic linkages의 가수 분해를 촉매 하는 효소의 한 종류이며, Fig. 1에 나타난 것처럼 α -glucose를 유리시키는 기질의 비 환원 말단 또는 glucosyl 잔기를 6-OH로 전이시켜 isomaltooligosaccharides (IMO)로 변환을 유도하는 효소 [1, 30]로서, α -D-glucosidase 또는 D-glucosyltransferase라고

*Corresponding author

Tel : +82-54-820-5465, Fax : +82-54-820-7705

E-mail : chung1409@anu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

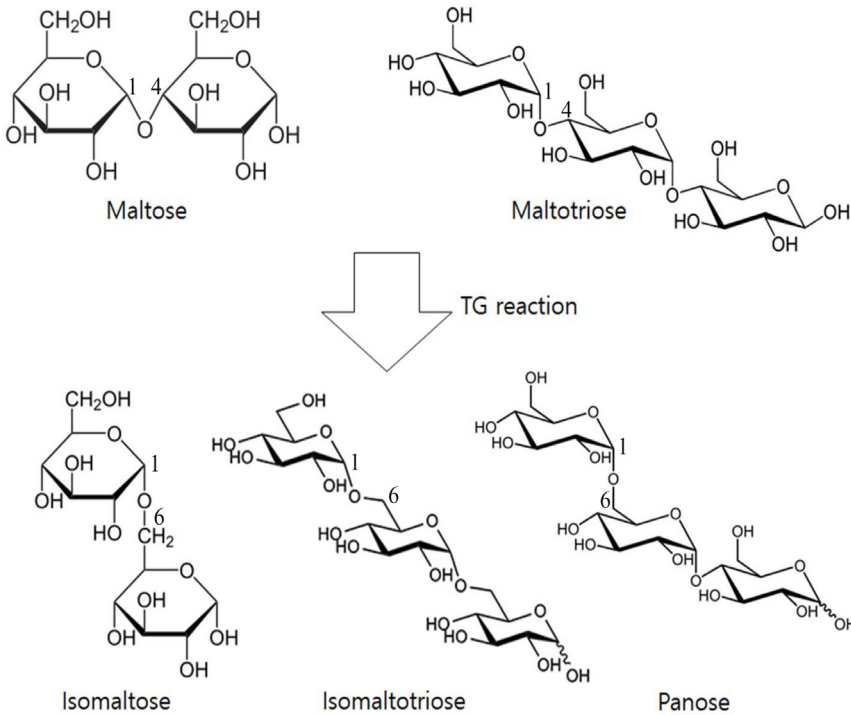


Fig. 1. The mechanism of TG reaction in polysaccharides. TG could synthesize α-(1→6) linkage isomaltoligosaccharide from α-(1→4) linked substrates.

불리기도 한다[30]. IMO는 α-(1→6)-glucosidic linkage를 가지고 있는 glucosylsaccharide를 말하며, isomaltose, panose, isomaltotriose 등을 주성분으로 한다[1, 4, 5, 25, 26, 34]. IMO는 장내의 *Bifidobacteria*의 성장과 복제를 촉진하여 정장작용을 촉진하며 장내의 pH를 저하시켜 유해균의 증식을 억제하며 충치예방과 혈청지질의 감소효과가 있으며 전분의 노화를 방지하고 식품의 보존 기간을 연장 할 수 있다고 보고되었다[12, 18].

이러한 연구를 통해 해외에서 개발된 TG 관련 제품은 식품물을 섭취할 때 함께 제품을 복용할 시 전분이 당으로 전환되는 것을 제한할 수 있고, 혈류로 당의 과 방출을 방지하는데 도움을 준다고 보고되었다[30]. 하지만 국내에서는 TG 관련 상품이 개발되지 않아 의약품 및 기능성 건강식품 시장에 판매되지 않고 있는 실정이다.

지난 몇 년 동안 TG에 대한 연구는 주로 screening 및 분리와 정제 및 특징 그리고 배양 최적화를 위해 노력해왔다[3, 5, 29]. 하지만 wild type 균주의 낮은 TG 생산으로 인해 산업 분야에서 비경제적으로 나타났으며, 이후 유전 공학 기술의 발달과 함께 유전자가 조작된 균주를 대규모 생산을 위한 숙주로 사용하는 새로운 방법이 연구 중이다[20]. 그럼에도 불구하고 *A. niger*로 얻는 TG 생산량은 여전히 낮으며, 생산성을 향상시키고 산업적 응용을 위한 추가 연구가 필요한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 *A. niger*가 생산하는 TG를 산업적으로 이용하기 위하여, TG 생산을 위한 최적의 *A. niger* 균주를 선별하고 선별된 균주에서 TG 생산을 위한 최적 배지와 배양 조건을 수립하고자 한다.

재료 및 방법

실험 균주

본 연구에서 사용된 균주 *A. niger* KCTC6913, 6911, 6906, 6985, C6144, 6592는 한국 생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)에서 구매하여 사용하였다.

균주 배양

*A. niger*를 배양하기 위하여 감자 전분 1.5%, 효모추출물 1.0%, 그리고 KH₂PO₄ 0.1%를 기본배양배지로 사용하였으며, 배양 용기 내 배지 volume 40%를 기본 조건으로 하여 30°C, 150 rpm의 조건에서 현탁배양 하였다.

최적 배지 조성 조사

TG 효소 활성에 탄소원이 미치는 영향을 조사하기 위해 감자 전분(Woomtree Co., Ltd., Korea), 고구마 전분(Gayasan general food Co., Ltd., Korea), 옥수수 전분(Tureban Co., Ltd., Korea), 밀 전분(Beksul Co., Ltd., Korea), 텍스트린(Qone Co., Ltd., Korea)을 각 시험군에 1.5%로 첨가하여 배양하였다. 질소원 종류에 따른 TG 효소 활성을 조사하기 위해 감자전분을 단일 탄소원으로 하여, 효모추출물(Choheung Co., Ltd., Korea), 맥아추출물(BD Co., Ltd., USA), 쇠고기추출물(BD Co., Ltd., USA)을 각 시험군에 1.0% 첨가하여 배양하였다. Straight jar 내의 산소포화도에 따른 TG 효소 활성에 미치는 영향을 조사하기 위해 각각 배지의 volume을 10, 20, 30, 그리고 60%로 조정 후 TG의 활성을 평가하였다.

탄소원/질소원 비율에 따른 TG 생산

TG 생산을 위한 탄소원과 질소원 확립 후, TG 생산을 위한 최적의 탄소원/질소원 비율을 조사하기 위해 탄소원과 질소원의 비율을 조절한 배지를 제조하여 세포생장 및 TG 생합성을 평가하였다.

TG 활성 측정

TG와 당화 효소(amyloglucosidase, AG)가 혼재되어 있는 효소액에 반응기질로 *p*-nitro phenyl glucopyranoside (*p*-NPG)와 AG억제제로 알려진 pyridine을 첨가하여 반응 시킨 다음, 알칼리 용액 내에서 발색 정도에 따라 TG만의 활성을 선택적으로 측정하는 원리를 이용하여 TG 활성을 측정하였으며 다음에 자세히 설명하였다[28]. 밀봉이 가능한 시험관에 10 mM *p*-NPG 1 ml, 0.2 M sodium acetate buffer (pH 5.5) 0.5 ml 그리고 5% (w/v) pyridine 100 µl를 첨가한 후, 50°C의 항온수조에서 5분 간 예열하고, 효소 시료액 200 µl를 첨가하고 흔들어서 50°C에서 10분간 반응한다. 정확히 10분 반응 한 후, 효소 반응액을 항온수조에서 꺼내고 0.2 M sodium carbonate 200 µl를 첨가하여 효소반응을 정지한다. 25°C에서 10분간 방치 한 후 spectrophotometer (Thermo, Germany)를 이용하여 파장 420 nm에서 흡광도 값을 측정 한다(A). 또한 공전시험액(Blank)으로는 10 mM *p*-NPG 1 ml, 0.2 M sodium acetate buffer (pH 5.5) 0.5 ml 그리고 5% (w/v) pyridine 100 µl를 첨가하고 혼합하여 항온수조 50°C에서 10분 간 방치 후, 0.2 M sodium carbonate 200 µl를 첨가하여 혼합하고 다시 효소 시료액 200 µl를 첨가한 것으로 하여 공전시험액의 흡광도 값을 측정 한다(B). *p*-nitrophenol의 표준곡선을 그려 기울기(a) 값을 얻는다. 활성의 정의는 다음과 같다. 상기 시험조건에 따라 시험할 때, 1분 동안 4-nitrophenyl α-D-glucopyranoside로부터 1 µg의 4-nitrophenol을 생성시키는 효소의 양을 1단위(Unit)로 하며 다음의 계산식을 이용한다.

$$TG \text{ activity (U/ml)} = 1/W \times (A-B)/a \times 1/10 \times 2$$

- W: 효소반응에 첨가된 시료의 양(ml)
- A: 효소 반응액의 흡광도
- B: 공전시험액의 흡광도
- a: 표준곡선의 기울기
- 1/10: 반응시간 보정계수
- 2: 부피 보정계수

결과 및 고찰

TG 생산 균주 선정

A. niger 균주 6 종을 이용하여 TG 활성이 가장 높은 균주를 선별하였다. 6 종의 *A. niger* 균주를 200 ml straight jar에 감자 전분 1.5%, 효모추출물 1.0%, KH₂PO₄ 0.1%를 조성으로 하는 배지를 30°C, 150 rpm의 조건으로 20일 동안 현탁배양하여

상층액을 분리해 TG 활성을 측정하였다. 그 결과 *A. niger* KCTC6913에서 다른 5 종의 균주에 비해 가장 높은 TG 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 이는 두 번째로 높은 TG 활성을 보인 *A. niger* KCTC6985 균주 보다 약 3배, 가장 낮은 TG 활성을 보인 *A. niger* KCTC6911 보다 약 7배 높은 TG 활성으로 이후 실험은 *A. niger* KCTC6913을 이용하여 진행하였다.

A. niger KCTC6913은 높은 지질대사 활성과 더불어 식품산업에 널리 사용되는 gluconic acid를 생산하는 등 당 대사 활성이 높은 것으로 알려져 있다. 특히, Okazaki에 따르면 dextrinogenic amylase에 의해 maltose가 형성되고 TG가 이를 기질로하여 비발효성 oligosaccharide로 변환되는 등 당 대사에 직접적으로 관련이 있다고 보고하였으며, Okazaki의 연구내용과 같이 TG의 활성에 있어 유리하게 작용한 것으로 유추된다[28].

A. niger KCTC6913을 대상으로 초기 pH와 배양 시간을 달리하여 배양한 뒤 생산되는 TG활성을 측정하였다. Fig. 3에는 나타내지 않았지만, 배양액의 pH를 각각 2~7로 설정하여 20일 동안 배양한 결과 배양 중기 및 배양 후기의 배지 내 pH는 초기 pH에서 크게 벗어나지 않아 *A. niger* KCTC6913의 경우 생장과 TG 활성에 초기 pH가 중요한 역할을 함을 확인할 수 있었다. Fig. 3에서 볼 수 있듯이, pH 5와 15일 배양 시 가장 높은 TG활성을 확인할 수 있었으며, 따라서 이후의 실험은 pH 5, 15일 배양을 기준으로 한 뒤 확인되는 TG활성을 기준으로 평가하였다.

탄소원에 따른 TG 활성의 영향

Batch culture 조건에서 탄소원에 따른 TG 활성에 미치는 영향을 조사하기 위해 감자 전분, 고구마 전분, 옥수수 전분, 밀 전분 그리고 텍스트린을 이용하였다. 각 탄소원을 1.5% 함

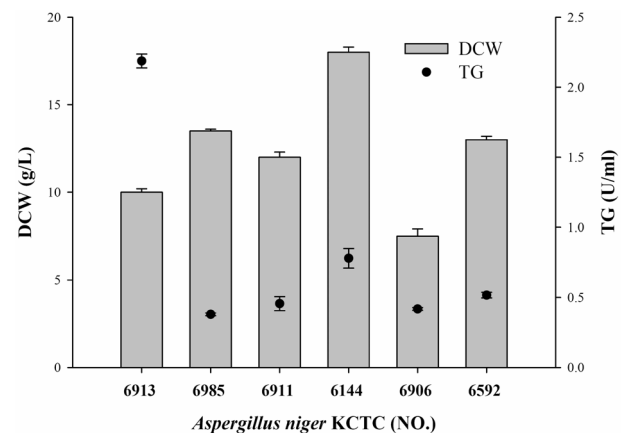


Fig. 2. The screening for optimum *Aspergillus niger* to produce TG. 6-different sub-species of *Aspergillus niger* were cultured under 30°C on basic media, and the TG activity assay was carried out with *p*-NPG assay.

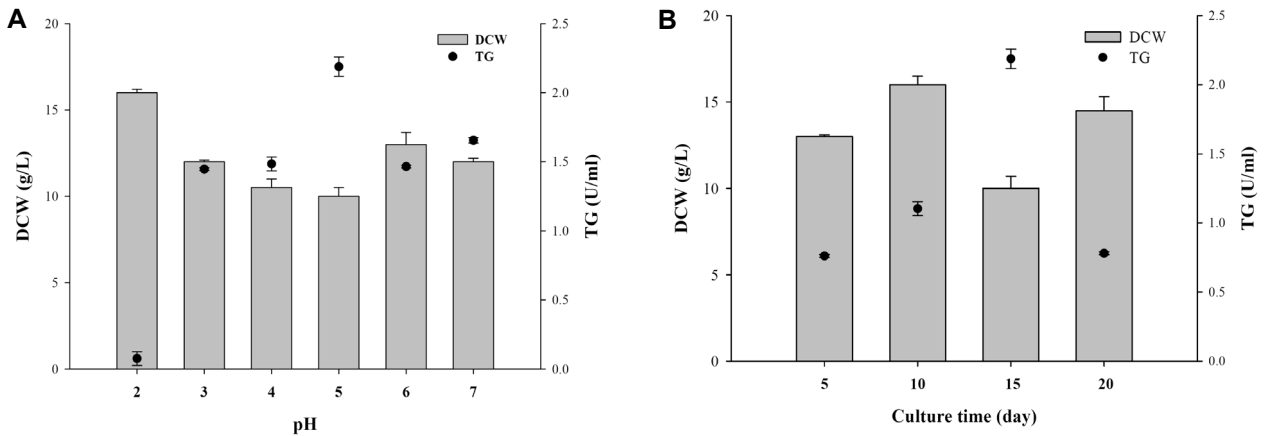


Fig. 3. The effect of the pH condition or incubation time for TG activity. To optimize the production of TG in *Aspergillus niger* KCTC6913, different pH condition (A) or incubation time (B) experiments were investigated.

유하는 배지에 *A. niger* KCTC6913 균주를 초기 pH 5.0, 배양온도 30°C 그리고 150 rpm으로 하여 15일 간 배양 후 5일 간격으로 *p*-NPG assay를 실시하였다.

그 결과, 감자 전분, 고구마 전분, 옥수수 전분, 밀 전분, 그리고 텍스트린을 각 탄소원으로 이용한 경우, 2.19, 1.8, 0.8, 0.6, 그리고 1.8 U/ml로 TG 활성이 나타나 기존에 이용하던 감자 전분이 차상위 활성을 보인 텍스트린 대비 1.2배 높은 활성을 나타냄을 확인하였다(Fig. 4A). 또한 가장 많은 양의 균체량

(dry cell weight, DCW)이 검출된 밀 전분 또는 옥수수 전분 첨가군에서 가장 낮은 TG 활성이 확인됨에 따라, 단순히 균체량에 따라 단위 세포 당 TG 활성 생산이 결정되는 것이 아님을 보여준다. 이는 감자 전분이 균체량 보다는 TG 생산에 특이적으로 유리한 탄소원으로 작용한다는 사실을 보여준다. 이러한 결과는 다양한 탄소원 가운데 maltose를 단일 기질로 하여 배양한 시험군에서 가장 높은 TG의 활성을 나타내었다는 보고를 미루어 볼 때[4], maltose를 단위체로 하는 amylose를 주성

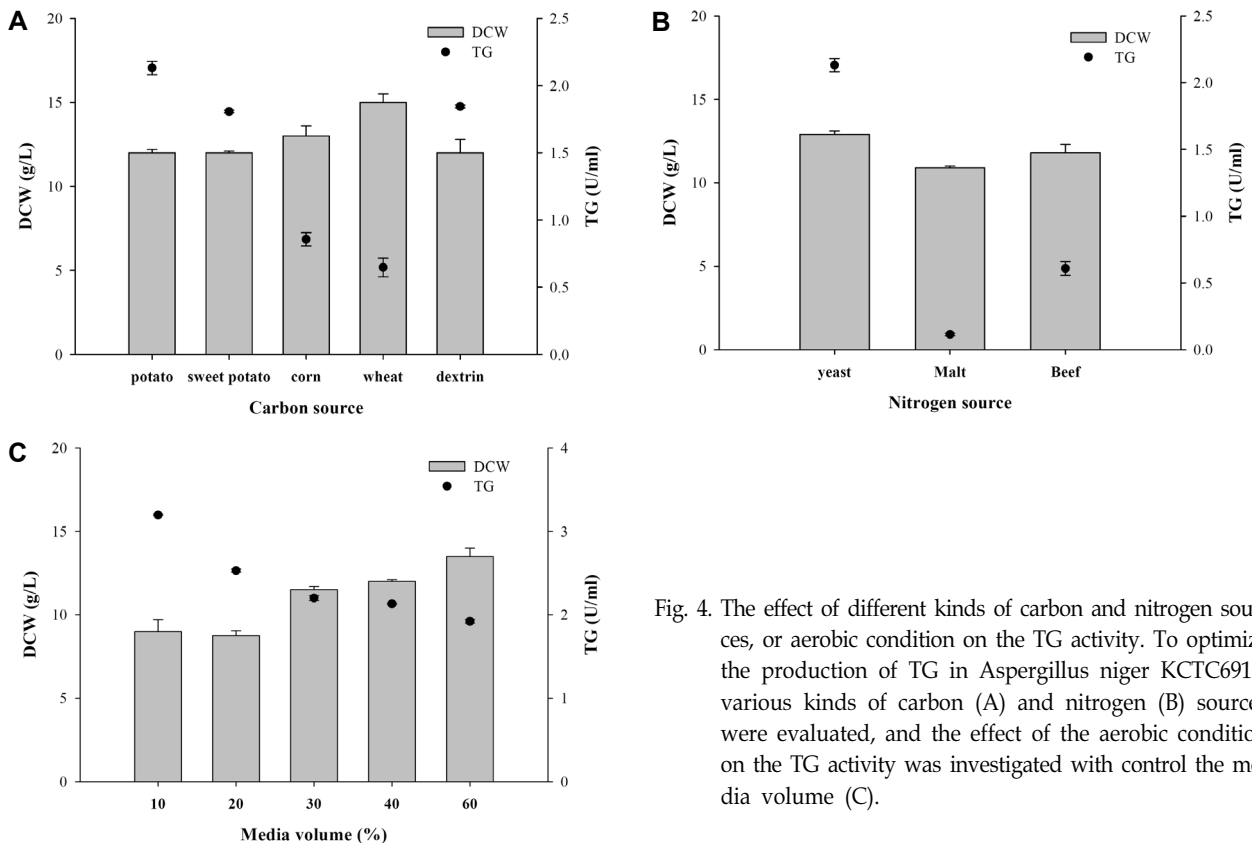


Fig. 4. The effect of different kinds of carbon and nitrogen sources, or aerobic condition on the TG activity. To optimize the production of TG in *Aspergillus niger* KCTC6913, various kinds of carbon (A) and nitrogen (B) sources were evaluated, and the effect of the aerobic condition on the TG activity was investigated with control the media volume (C).

분으로 하는 감자 전분이 TG 활성 유도에 긍정적 영향을 미쳤을 것으로 기대된다. 전분은 주로 아밀로스와 아밀로펙틴으로 구성되어 있으며, 감자 전분에 포함된 아밀로스를 100%로 생각할 때 고구마 전분에는 약 75.2%의 아밀로스가 존재하는 것으로 알려져 있다[33]. 또한 *A. niger*의 TG는 주어진 maltose 기질의 약 50%를 isomaltose, isomaltotriose, panose 등의 IMO로 형성한 뒤, IMO로부터 glucose를 형성하는 것으로 알려져 있다[1]. TG는 maltose를 기질로 하는 당대사와 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있어, 감자전분에서 가장 높은 TG 활성을 보인 본 실험의 결과와 부합하는 것으로 사료된다.

질소원에 따른 TG 활성의 영향

질소원에 따른 TG 활성을 평가하기 위해 효모추출물, 맥아추출물, 쇠고기추출물을 질소원으로 사용하였다. 각 질소원이 1.0% 함유된 배지에 *A. niger* KCTC6913 균주 접종 후 pH 5.0, 30°C, 150 rpm으로 15일 동안 배양하여 TG 활성을 확인하였다.

질소원에 따른 TG 활성을 측정된 결과 효모추출물을 이용한 시험군에서 2.1 U/ml, 맥아추출물 및 쇠고기추출물을 이용한 시험군에서 각각 0.1 및 0.6 U/ml의 활성을 나타내어 3.5배~20.0배까지 활성의 차이를 보였다(Fig. 4B). 이러한 결과는 maltose 50% 및 질소화합물 5% 내외로 구성된 맥아추출물과는 달리 질소화합물의 함유량이 40% 이상인 효모추출물에서 충분한 양의 질소원을 획득함에 따라 유도된 결과인 것으로 유추된다. 특히, Lee and Chen (1997)에 따르면 효모, 맥아, 펩톤, 옥수수 침지액 등의 추출물과 황화암모늄, 알라닌 그리고 아스파라긴과 같은 단일 질소원을 각각 이용하였을 때 아스파라긴 단일 질소원 첨가 시 균체량의 질량이 최소 균체량을 보인 요산 첨가군 대비 8배 가량 높은 수치를 나타내었으나 효소 활성은 최하위 수준임을 확인하였으며, 효모추출물 이용 시 상대적으로 적은 균체량에도 불구하고 아스파라긴 단일 질소원 첨가군 대비 TG 활성이 11배 가량 높게 나타난 것을 확인할 수 있다[20]. 본 연구에서 마찬가지로 효모추출물 이용한 시험군에서 유사하게 나타난 것을 미루어 볼 때, TG 효소의 활성에 있어 단순 세포 수의 양이 결정적인 요소가 아닌 것을 다시 한 번 확인할 수 있었다.

용존산소량에 따른 TG 활성의 영향

TG 생산에 있어서 straight jar 내의 산소포화량이 TG 활성에 미치는 영향을 확인하기 위해 상기 확립된 배지 조성 배지의 volume을 달리하여 초기 pH 5.0, 30°C 그리고 150 rpm의 조건으로 15일 동안 배양하여 5일 간격으로 TG 활성을 확인하였다. 그 결과 straight jar 내의 산소포화량이 증가함에 따라 TG의 활성이 증가됨을 확인할 수 있었고, straight jar 내의 산소포화량이 가장 높은 10%(v/v)의 배지 조성에서 3.2 U/ml의 활성을 얻었다(Fig. 4C). 또한 기존 배지의 조성 vol-

ume인 40%(v/v)과 비교하여 10%(v/v)에서 1.5배 높은 TG의 활성을 확인 하였다. 이러한 사실로 *A. niger* KCTC6913 균주 배양에 있어 TG의 높은 활성을 얻기 위해서는 호기적 조건이 상대적으로 유리함을 알 수 있다. Park *et al.*,에 따르면 *A. niger* 균주를 사용하여 sodium gluconate의 높은 활성을 얻기 위해 용존산소량의 수준을 각각 30%, 50%, 70%로 배양하였을 때 30%로 유지하는 배양보다 70%로 유지 한 배양에서 75% 높은 생산성을 보인 결과와 유사한 것으로 보이며[31], Jafari *et al.*,의 보고에서 교반속도를 150~400 rpm까지 50단위로 하여 *A. niger* 균주를 이용한 glucose oxidase의 생산성을 확인 한 결과 rpm의 증가에 따라 상승곡선을 나타낸 결과와 유사한 것으로 생각된다[8].

탄소원/질소원 비율이 TG 활성에 미치는 영향

Fig. 4에서 언급했듯이 감자 전분과 효모추출물은 TG 생산을 위한 가장 적합한 탄소원 및 질소원임을 확인하였다. 이에 최적 배지로 선정된 탄소원 및 질소원의 비율이 TG 활성에 미치는 영향을 확인하기 위해, 감자 전분 및 효모추출물의 기본 첨가비율인 1.5:1.0(wt/v)을 다양하게 변화시켜 그 결과를 확인하였다. 탄소원 혹은 질소원을 고정된 뒤 탄소원 및 질소원의 비율을 1:1, 2:1, 1.5:0.5, 1.5:1.5(wt/v)로 변화한 뒤, pH 5.0, 30°C 그리고 150 rpm의 조건으로 15일 동안 배양하고 5일 간격으로 TG의 활성을 조사하였다. 그 결과 균체량의 경우 모든 시험군에서 유사한 수치를 나타내 비율에 따른 유의미한 변화를 관찰할 수 없었으며, TG 활성의 경우 탄소원을 고정된 후 질소원의 양을 증가시킨 1.5:1.5(wt/v)의 C/N ratio의 조건에서 5.1 U/ml의 TG활성을 확인할 수 있었으며 이는 기본 조성 배지에 비해 1.3배 증가한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

Kazemi *et al.*,에 따르면 *A. niger* 균주를 이용한 β -galactosidase의 생산 최적 조건 연구에서 탄소원과 질소원을 각각 1.0%, 2.0% 그리고 3.0%(w/v)로 하여 효소 활성을 비교하였을 때 1.0%와 2.0%에서 가장 높은 활성을 나타내고 3.0%에서 최하수준을 보였는데, 고농도에서의 활성 감소 현상은 높은 포도당 농도에 따른 대사 저해 현상으로 보고 된 바 있다[11]. Kazemi는 또한 질소원으로 효모추출물을 이용하였을 때 풍부한 질소, 핵산 및 무기물을 바탕으로 생존 가능한 유기체가 증가했다고 보고 하였는데, 이러한 결과는 본 연구의 Fig. 4에서 효모추출물을 이용한 그룹에서 가장 높은 균체량을 확인한 것과 유사한 결과임을 확인할 수 있었다[11].

기본 조성 배지, 최적 조성 배지 및 PDB 배지의 TG 활성 비교

앞선 결과에서 볼 수 있듯이 TG 생산을 위한 최적의 탄소원, 질소원, 용존산소, C/N 비율 등의 배양 조건은 다음과 같이 결정되었다: 탄소원으로 감자전분과 질소원으로 효모추출물을 배양액의 1.5%로 각각 사용하여 호기적 조건에서 배양.

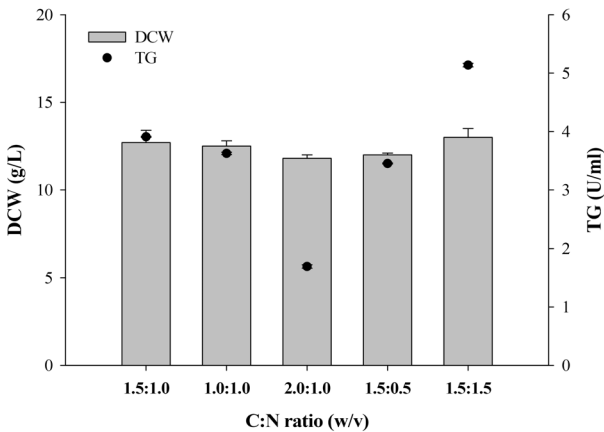


Fig. 5. The effect of the C/N ratio on the TG activity. The basic C/N ratio was 1.5:1.0(wt/v%) and four kinds of different C/N ratio were investigated. The *Aspergillus niger* KCTC6913 was cultured 15 days on initial pH 5.0 for each media.

확립된 최적배양 조건에서의 TG 생산을 평가하고자 기본조성 배지 및 *A. niger* 배양에 일반적으로 널리 사용되고 있는 potato dextrose broth (PDB) 배지를 대조군으로 사용하여 *A. niger* KCTC6913의 TG 생산을 실시하였다. 초기 pH 5.0, 30°C, 배지 volume 10% 그리고 150 rpm의 조건으로 *A. niger* KCTC6913 균주를 15일 동안 배양하였고 5일 간격으로 TG의 활성을 조사하였다.

Fig. 6에서 볼 수 있듯이, 본 연구에서 확립한 최적의 TG 생산 배지는 대조군으로 사용한 2 종류의 배지와 비교할 때 배양 후 세포 중량은 비슷한 것으로 나타났으나, TG 활성의 경우 매우 다른 양상을 보였다. 즉, 배양 후 TG 활성은 기본 조성 배지에서 3.9 U/ml, PDB 배지에서 1.3 U/ml, 최적 조성 배지에서 5.1 U/ml의 활성을 보였으며, 이는 최적 조성의 배

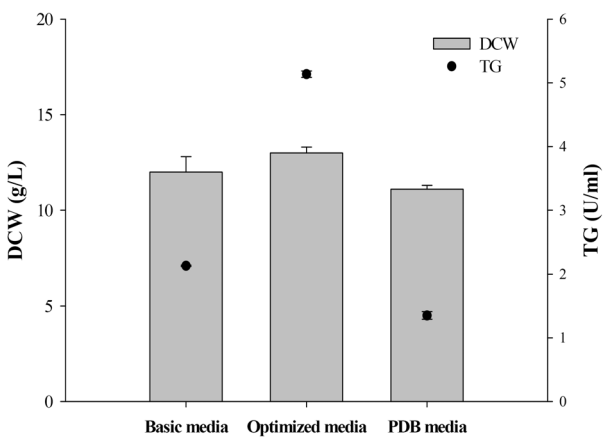


Fig. 6. Evaluation of the optimized media for TG activity. The basic and PDB media were used as control media for TG production, and the *Aspergillus niger* KCTC6913 was cultured 15 days on initial pH 5.0 for each media.

지가 기본 조성 배지에 비해 1.3배, PDB 배지에 비해 4배 높은 TG의 활성을 나타내어, 본 연구에서 확립한 TG 생산을 위한 최적 배지 및 배양 조건이 성공적으로 확립되었음을 시사한다.

감사의 글

이 논문은 2016학년도 안동대학교 연구비에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

References

- Ahn, J. W., Hong, S. S., Park, K. W. and Seo, J. H. 1996. Reaction mode of transglucosidase from *Aspergillus niger* for production of isomaltooligosaccharides. *Kor. J. Food Sci. Technol. KJFST.* **28**, 273-278.
- Bailey, C. J. 1999. Insulin resistance and antidiabetic drugs. *Biochem. Pharmacol.* **58**, 1511-1520.
- Brizova, K., Kralova, B., Demnerova, K. and Vins, I. 1992. Isolation and characterization of alpha-glucosidase from *Aspergillus niger*. *J. Chromatogr.* **593**, 125-131.
- Chen, W. C., Hung, T. F and Lee, S. L. 1997. Production of glucosyl-transferring enzyme by *Aspergillus niger* in batch cultures. *Biotechnol. Lett.* **19**, 949-951.
- Chen, G. G., Li, W., Zhang, Y. K., Qin, Y. L., Wu, K. Y. and Liang, Z. Q. 2011. A high-throughput method for screening of *Aspergillus niger* mutants with high transglycosylation activity by detecting non-fermentable reducing sugar. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 1519-1523.
- Dillmann, W. H. 1980. Diabetes mellitus induces changes in cardiac myosin of the rat. *Diabetes* **29**, 579-582.
- Hesta, M., Debraekeleer, J., Janssens, G. P. and De Wilde, R. 2001. The effect of a commercial high-fibre diet and an iso-malto-oligosaccharide-supplemented diet on post-prandial glucose concentrations in dogs. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)* **85**, 217-221.
- Jafari, A. R., Sarrafzadeh, M. H., Alemzadeh, I. and Vosoughi, M. 2007. Effect of stirrer speed and aeration rate on the production of glucose oxidase by *Aspergillus niger*. *Int. J. Biol. Sci.* **7**, 270-275.
- Kaneko, T., Kohmoto, T., Kikuchi, H., Fukui, F., Shiota, M., Yatake, T., Takaku, H. and Iino, H. 1992. Digestibility of isomaltooligosaccharides by rats and effects on serum lipids. *J. Agric. Chem. Soc. Jpn.* **66**, 1211-1220.
- Kang, J. R., Lee, S. J., Kwon, H. J., Kwon, M. H. and Sung, N. J. 2012. Establishment of extraction conditions for the optimization of the black garlic antioxidant activity using the response surface methodology. *Kor. J. Food. Preserv.* **19**, 577-585.
- Kazemi, S., Khayati, G. and Faezi-Ghasemi, M. 2016. Beta-galactosidase production by *Aspergillus niger* ATCC 9142 using inexpensive substrates in solid-state fermentation: optimization by orthogonal arrays design. *Iran. Biomed. J.* **20**, 287-294.
- Ketabi, A., Dieleman, L. and Gänzle, M. 2011. Influence of

- isomalto-oligosaccharides on intestinal microbiota in rats. *J. Appl. Microbiol.* **110**, 1297-1306.
13. Kim, D. J., Kim, J. M., Kim, T. H., Baek, J. M., Kim, H. S. and Choe, M. 2010. Effects of mixed extract from lycium chinense, cordyceps militaris, and acanthopanax senticosus on glucose-regulating enzymes of HepG2 in hyperglycemic conditions. *J. Kor. Soc. Food. Sci. Nutr.* **39**, 1257-1262.
 14. Kim, H. S., Kim, T. W., Kim, D. J., Kim, K. K. and Choe, M. 2013. Effects of medicinal plant water extracts on expression of anti-diabetic enzymes mRNA. *J. Kor. Soc. Food. Sci. Nutr.* **42**, 1008-1014.
 15. Kim, H. S., Kim, T. W., Kim, D. J., Lee, J. S. and Choe, M. 2013. Effects of medicinal herb water extracts on expression of hepatic glucokinase, pyruvate dehydrogenase and acetyl-CoA carboxylase mRNA. *Kor. J. Nutr.* **46**, 119-125.
 16. Kim, J. W., Cha, J. Y., Heo, J. S., Jin, H. J. and Cho, Y. S. 2008. Hypoglycemic effect of chlorella sp. CMS-1 hot water extract on streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Life Sci.* **18**, 1584-1591.
 17. Kim, N. M., Lee, J. S. and Lee, B. H. 1999. Effects of β -amylase and transglucosidase on the qualities of red ginseng extract. *J. Ginseng. Res.* **23**, 93-98.
 18. Kim, Y. 1998. Effect of fructo-oligosaccharide and isomalto-oligosaccharide on quality and staling of cake. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **27**, 875-880.
 19. Lee, S. E., Seong, N. S., Bang, J. K., Park, C. G., Sung, J. S. and Song, J. 2003. Antioxidative activities of Korean medicinal plants. *Kor. J. Medicinal Crop Sci.* **11**, 127-134.
 20. Lee, S. and Chen, W. 1997. Optimization of medium composition for the production of glucosyltransferase by *Aspergillus niger* with response surface methodology. *Enzyme Microb. Technol.* **21**, 436-440.
 21. Lehmann, U. and Robin, F. 2007. Slowly digestible starch - its structure and health implications: a review. *Trends. Food. Sci. Technol.* **18**, 346-355.
 22. Lim, S. J. and Park, H. J. 2000. The effect of BuOH fraction of polygonatum odoratum with selenium on blood glucose level and lipid peroxidation in streptozotocin induced diabetic rats. *Kor. J. Nutr.* **33**, 703-711.
 23. Magnuson, J. K. and Lasure, L. L. 2004. Organic acid production by filamentous fungi. pp. 307-340, *Advances in fungal biotechnology for industry, agriculture, and medicine*, Springer.
 24. Mahadik, N. D., Puntambekar, U. S., Bastawde, K. B., Khire, J. M. and Gokhale, D. V. 2002. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Process Biochem.* **38**, 715-721.
 25. McCleary, B. V., Bouhet, F. and Driguez, H. 1991. Measurement of amyloglucosidase using p-nitrophenyl β -maltoside as substrate. *Biotechnol. Tech.* **5**, 255-258.
 26. Mendis, M., Mendoza, B. R. and Simsek, S. 2012. Covalent immobilization of transglucosidase onto polymer beads for production of isomaltooligosaccharides. *Catal. Lett.* **142**, 1107-1113.
 27. O'Dea, K., Snow, P. and Nestel, P. 1981. Rate of starch hydrolysis *in vitro* as a predictor of metabolic responses to complex carbohydrate *in vivo*. *Am. J. Clin. Nutr.* **34**, 1991-1993.
 28. Okazaki, H. 1956. Joint action of a dextrinogenic amylase, a glucose-producing amylase and transglucosidase upon starch in the presence or absence of yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* **63**, 322-333.
 29. Ota, M., Okamoto, T. and Wakabayashi, H. 2009. Action of transglucosidase from *Aspergillus niger* on maltoheptaose and [U-(13)^C] maltose. *Carbohydr. Res.* **344**, 460-465.
 30. Pan, Y. C. and Lee, W. C. 2005. Production of high-purity isomalto-oligosaccharides syrup by the enzymatic conversion of transglucosidase and fermentation of yeast cells. *Biotechnol. Bioeng.* **89**, 797-804.
 31. Park, B. S., Cho, B. K., Lee, S. W., Lim, S. W., Kim, D. I. and Kim, B. G. 1999. Optimization of biotransformation process for sodium gluconate production by *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **14**, 309-314.
 32. Sasaki, M., Ogasawara, N., Funaki, Y., Mizuno, M., Iida, A., Goto, C., Koikeda, S., Kasugai, K. and Joh, T. 2013. Transglucosidase improves the gut microbiota profile of type 2 diabetes mellitus patients: a randomized double-blind, placebo-controlled study. *BMC Gastroenterol.* **13**, 81-230X-13-81.
 33. Takizawa, F. F., Silva, G. O., Konkel, F. E. and Demiate, I. M. 2004. Characterization of tropical starches modified with potassium permanganate and lactic acid. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **47**, 921-931.
 34. Zhang, L., Jiang, Y., Jiang, Z., Sun, X., Shi, J., Cheng, W. and Sun, Q. 2009. Immobilized transglucosidase in biomimetic polymer - inorganic hybrid capsules for efficient conversion of maltose to isomaltooligosaccharides. *Biochem. Eng. J.* **46**, 186-192.

초록 : *Aspergillus niger*가 생산하는 transglucosidase의 최적 생산 조건 확립

이준엽^{1,2} · 강성호¹ · 김종식¹ · 정정욱^{1*}

(¹국립안동대학교 생명과학과, ²넉시스)

본 연구에서는 *Aspergillus niger* 유래 TG의 최적 생산 조건을 연구하기 위해, *A. niger* 6 종을 이용하여 감자 전분 1.5%, 효모추출물 1.0%, KH₂PO₄ 0.1%, 40%(v/v) volume의 배지를 기본 조성으로 하는 배지를 사용하였다. 기본 조성의 배지의 초기 pH를 달리하여 30°C, 150 rpm의 조건으로 20일 동안 5일 간격으로 배양을 하여 TG 활성을 측정된 결과 초기 pH 5.0, 배양 15일, 그리고 *A. niger* KCTC6913 균주에서 가장 높은 TG 활성을 확인하였다. TG 생산에 유리한 탄소원, 질소원을 확립하기 위해 5 종의 다른 탄소원(감자 전분, 고구마 전분, 옥수수 전분, 밀 전분, 텍스트린) 또는 3종의 다른 질소원(효모추출물, 맥아추출물 및 쇠고기추출물)을 이용하여 초기 pH 5.0, 15일 배양한 후 TG 활성을 측정된 결과, 기본 조성 배지인 감자 전분 및 효모추출물에서 가장 높은 TG 활성을 확인 하였다. 또한 *A. niger* KCTC6913 균주는 호기적 조건 및 탄소원:질소원의 비율을 조절함에 따라 TG 생산이 증가함을 확인하였다. 확립된 최적 배지 및 배양 조건에서 TG 활성을 평가하기 위해 기본배지 및 *A. niger* 배양에 널리 이용되는 PDB 배지를 대조군으로 하여 비교한 결과 기본 조성의 배지에 비해 1.3배, PDB 배지에 비해 4배 높은 TG 활성을 확인 하였다. 종합적으로 이러한 연구결과는 *A. niger* 유래의 TG를 산업적으로 이용하기 위한 최적 배양 배지 및 배양 조건을 성공적으로 수립하였음을 시사한다.