

특집: 산업적 유용미생물(II)

Aspergillus균주의 특징과 산업적 응용

이 동 건

KIST 생명공학연구소 단백질공학 연구부

동양의 문화를 곰팡이의 문화라고 일컬어지고 있듯이 오래 전부터 우리의 생활과 밀접한 관계를 맺어 온 것이 사실이다. 하지만 지구상에서 곰팡이가 언제부터 서식하게 되었는가는 아무도 알 수 없다. 또한 우리들에게는 어떠한 경로로 부터 곰팡이가 언제, 어디에서, 어떻게 진화되었는가에 대해서도 정확한 지점은 없다. 이러한 가운데 중국, 일본 그리고 동남아시아를 비롯하여 우리의 생활, 특히 식생활에 오래전부터 많은 관계를 가져온 것이 사실이다.

이러한 곰팡이를 대상으로 유전적인 성질, 생리적인 성질, 생화학적인 성질 그리고 형태적인면을 중심으로 많은 연구가 이루어져 왔지만 다른 미생물과 비교해 볼 때 아직까지 미흡한 것이 사실이다. 그러한 가운데 산업적으로 유용한 이차대사산물을 다른 생물체와는 달리 체외로 많이 분비하는 잇점을 가지고 있어 우리의 산업적 이용 즉 간장, 된장, 주류 등의 발효식품의 제조나 식품제조에 필요한 공업용 효소생산(1,2), 유기산의 생산(3-5) 그리고 항생제나 효소제제 등의 의약품생산에는 빼놓을 수 없는 유용균주로서 중요한 위치를 차지하고 있다.

80년대에 접어들면서 유전공학기술의 발달과 함께 좀더 그 유용성의 가치를 높이기 위해서 분자생물학적 수준에서 연구가 많이 진행되어지고 있으며, 그 유전공학기술을 이용하

여 보다 산업적인 가치가 있는 물질을 대량 생산 할 수 있는 우량 균주의 육종에 많은 노력을 기울이고 있다. 이러한 점으로 미루어볼 때 앞으로 곰팡이도 Biotechnology의 발전에 큰 몫을 하리라고 기대된다. 또한 곰팡이는 분해효소등을 중심으로 많은 종류의 효소가 균체외로 분비되는 성질을 이용해서 이중단백질의 생산에도 유망한 숙주로서 기대된다. 특히 당단백질의 경우 정확한 당수식이 일어난다는 잇점이 있어 생산된 단백질의 안정성에 크게 기여할 것으로 생각된다. 현재 전세계의 공업용 효소의 생산에 약 28% 정도가 곰팡이에서 생산되고 있는 실정이며 공업적으로 주요한 곰팡이는 표 1에 나타나는 것과 같다. 이러한 산업적으로 유용한 곰팡이중 *Aspergillus*속을 중심으로 그 형태학적인 성질, 분류체계, 산업적인 이용도와 그 가치성에 대하여 살펴보고자 한다.

Aspergillus속의 형태학적인 특징

*Aspergillus*속은 fungi를 체계적으로 분류한 Anisworth에 의하면 Eumycota(門), Plectomycetes(綱), Eurotiales(目), Eurotiaceae(科)에 속하며 유성생식을 가지지 않는 균류(불완전세대)를 말한다. 이균류는 사상의 균사(hyphae)를 갖는 비광합성 균류이며, 균사는 영양분을 섭취하여 선단생장(apical growth)하며 공기중에 돌출된 균사(기균사)의 선단에는 무성적으로 포자를 착생시켜 자실체를 만든다. 이렇게 만들어진 포자는 적당한 환경에서 발아(germination)하여 다시 균사를 형성하는 무성적인 생활환(asexual life cycle)을 가지고 살아간다. 이러한 *Aspergillus*속의 일반적인 형태를 그림 1에 나타내었으며, 지금까지 분류체계에 이러한 형태적인 면을 중심으로 많은 연구가 진행되었다. 그리고 *Aspergillus*속의 특징중세포벽 성분의 화학적인 분석에 의하면 β -1,3-glucan이 세포벽 건조중량의 43%를 차지하며 chitin이 19%, protein이 11%, lipid가 5% 등의 조성을 가지며 이러한 조성이 *Aspergillus*속의 또 하나의 특징이 되기도 한다.

Aspergillus속의 포자의 색

사상균의 경우 분생포자(Conidia)가 함유하고 있는 색소의 종류에 따라 각 균종들간에 특유의 색조를 띠고 있다. 특히

표 1. 공업생산에 사용되어지는 주요 사상균과 그 생산물질

종류	주요 생산물
<i>Aspergillus awamori</i>	glucoamylase, protease 등
<i>Aspergillus niger</i>	glucosyltransferase, glucoamylase, α -amylase, protease, catalase, cellulase, α -galactosidase, lipase, glucose oxidase, citric acid, β -glucosidase, gluconic acid, pectinase 등
<i>Aspergillus oryzae</i>	α -amylase, glucoamylase, glucosyltransferase, lipase, pectinase 등
<i>Cepharosporium acremonium</i>	cepharosporin(β -lactam 항생제)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	penicillin, peroxidase
<i>Trichoderma reesei</i>	cellulase
<i>Mucor circinelloides</i>	lipase
<i>Rhizopus delemar</i>	amyloglucosidase, lipase
<i>Fusarium oxysporum</i>	penicillin amidase

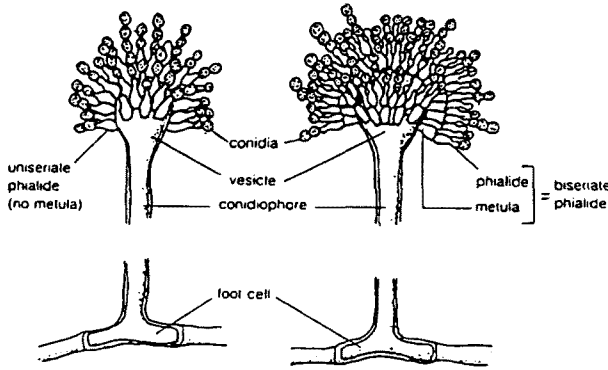


그림 1. *Aspergillus*속의 형태.

*Aspergillus*속에서도 흑색, 갈색, 청색, 녹색, 백색 혹은 이러한 색깔들의 중간색을 나타내는 포자들을 형성하며, 이러한 포자의 색을 이용하여 분류학상의 중요한 표준(Key), 혹은 유전학상(Genetic marker)의 표식으로 되고 있다. 예를 들어 국균(*Aspergillus* sp)도 일반적으로는 이러한 색깔에 의해 흑국균, 황국균, 백국균등으로 구별 되어지고 있다. 하지만 지금까지 이러한 색소의 본질과 그 생성기구에 대한 연구는 미흡한 실정이며, *Aspergillus*속의 분생포자가 생성하는 색소에 대해서는 유일하게 *Aspergillus niger*의 포자에서 추출한 Aspergillin 이 보고되고 있다(6). 하지만 이 색소의 구조에 대해서는 아직 불분명한 실정이며, 배지중에 용출되는 색소에 관해서는 비교적 연구가 많이 되어 있다고 본다. 단지 *Aspergillus*속의 포자 색과 금속과의 관계에 대한 연구가 좀 이루어 지고 있으며, 사상균의 정상적인 발육에는 Fe, Zn, Mn, Cu 등과 같은 4종류의 미량의 금속이 필요하다고 보고되어 있다(7,8). 이러한 미량의

금속이 포자의 색깔 형성에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며, *Aspergillus niger*에서는 Fe, Zn이 발육에 영향을 미치며, 특히 Mn이 과량 존재하면 포자의 형성이 저해 될 뿐만 아니라 포자의 색깔이 흑색인 경우 황색, 혹은 백색으로 변하는 변이주의 형성이 생긴다는 연구보고(9)가 있어, 지금까지 *Aspergillus*속의 분류학상의 연구에 생화학적인 성질, 포자의 형태, 색깔 등을 중심으로 연구가 진행된 데에 의하면 이러한 포자의 색깔에 영향을 미치는 다른 요소와 그 색소의 본질에 대한 연구가 더 필요한 실정이다.

***Aspergillus*속의 분류체계**

*Aspergillus*속은 1965년 Raper & Fennel(10)과 1985년 Gams(11) 등에 의해 분류체계가 정립되었으며 두 사람 분류체계의 상호관계를 그림 2에 나타내었다. Raper & Fennel 등은 *Aspergillus*속가운데 132종과 변종18종을 나타내었으며, 이것을 18 group으로 체계화 하였다. 이 group을 나누는데 사용한 분류형질은 분생자의 색, 형태, 자낭의 형태, 분생자 형성세포의 상태, 분생자병의 표면과 그 착색 등의 성질을 이용하여 분류체계를 이루는데 사용하였다. 한편 이러한 형태학적인 분류체계는 한계가 있으므로 새로운 분류체계의 필요성이 지적되고 있다(12). 그러한 가운데 세균, 효모의 분류체계에 실제 도입되어지고 있는 화학분류학적 기준에 의한 분류가 *Aspergillus*속의 분류체계에도 도입되어지고 있다. 이러한 화학분류학적 기준에는 생명유지에 없어서는 안될 요소 즉 DNA, RNA, 단백질과 같은 정보 고분자와 세포벽의 구성성분, 균체의 지방산조성, Quinone계 등이 있다. 그리고 Nelson & Garber(13), Nasuno(14-17), Kurzeja & Garber(18) 등은 세균, 효모의 분류에 널리사용 되어지고 있는 효소나 단백질의 전기영동

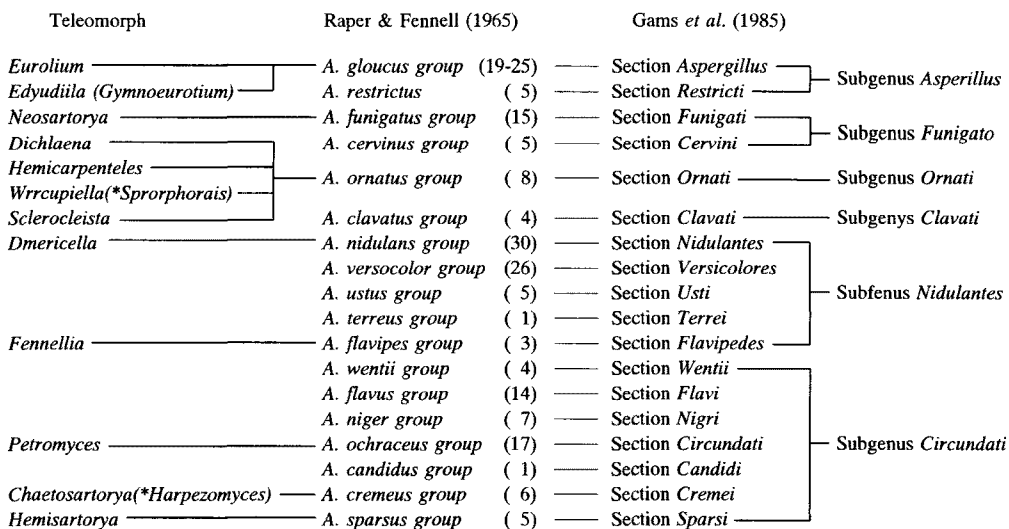


그림 2. *Aspergillus*속에 분류체계 : Raper & Fennell(1965)과 Gams et al(1985)과의 관계.

표 2. Aspergillus속의 種內DNA상동성 및 DNA염기조성

종류	NRRL번호	種內DNA상동치 (%)	GC함량 (mol %)
<i>A. flavus</i>	1957(R) ^a		49.8±0.14
	482	95	49.2±0.04
	3251	96	49.5±0.19
	13135	97	49.1±0.56
<i>A. oryzae</i>	13136	97	49.9±0.04
	447(R)		49.6±0.09
<i>A. parastictus</i>	451	100	49.3±0.05
	502(T) ^b		49.1±0.13
<i>A. sojae</i>	465	100	50.0±0.06
	5595(R)		49.3±0.05
<i>A. tamarii</i>	5594	100	49.2±0.14
	429(R)		48.6±0.13
<i>A. leporis</i>	13139	100	48.8±0.25
	3216(T)		49.2±0.04
<i>A. nominus</i>	13137(T)		50.0±0.11
	3353	92	50.0±0.25
	3161	85	50.4±0.19
	5919	100	49.7±0.10
	6343	99	49.8±0.00
	6552	97	50.1±0.08
	13138	91	49.7±0.21

^a대표주, ^b표준주

파턴에 의한 분류를 *Aspergillus*속의 분류에 적용시켰다. 이러한 신 분류체계를 이용하여 80년 후반 미국 NRRL(Northern Regional Research Center, Peoria, Illinois)에 있는 Kirtzman은 *A. flavus*와 그 표현형이 유사한 6종간의 DNA염기조성(GC 함량)을 결정한 후, 분광학적인 방법에 의해 DNA상동성실험을 처음으로 시도(19, 20)하였으며, 그 결과 같은 *Aspergillus*속간은 85% 이상의 상동성이 있는것으로 나타났다(표 2). 이러한 결과를 놓고 볼 때 앞으로 *Aspergillus*속간의 분류에도 분자생물학적인 기법이 더욱더 도입될 것으로 생각되어진다.

Aspergillus속의 유전자 발현조절계

*Aspergillus nidulans*에는 유성세대 또는 준유성세대가 존재하여 이러한 생활환을 이용하여 유전학적인 연구가 많이 진행되어 왔다. 그러므로 유전자의 발현조절체계에 관한 연구에서도 많은 정보가 축적되었다. 이러한 발현조절체계를 크게 대별해 보면, pathway specific regulatory genes, wide domain regulatory genes, integrater gene 등 3종류로 나눌수 있다. pathway specific regulatory genes의 경우 *prnA*, *nirA*, *alcR* 등의 유전자가 알려져 있으며, proline대사계의 유전자군(*prnA*, *prnX*, *prnD*, *prnB*, *prnD*: 그림 3)은 proline이 없으면 전사가 되지 않으며 PrnA의 단백질가 proline에 의한 유도를 증계하는 역할을 하고 있다. 또한 탄소원으로서 조절되어지는 암모니움제어계(*areA* 유전자 산물)와 catabolite(*CreA* 유전자 산물)제어계에 의해서도 유전자의 발현이 조절되게 된다(그림 3). 그러므로

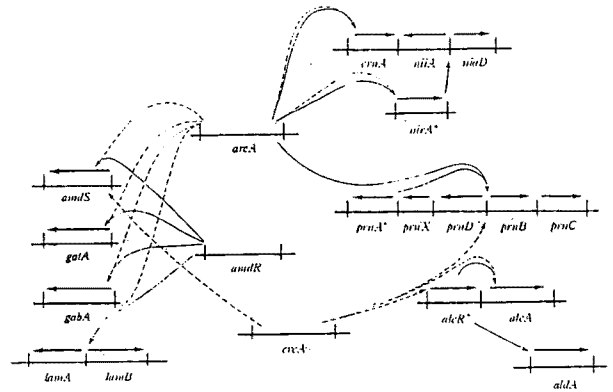


그림 3. 유전자 발현 제어계의 Network.

PrnA, AreA, CreA단백질이 *prnB*와 *prnD*의 promotor영역에 경쟁적으로 결합하여 발현이 조절되어 진다고 생각된다. 한편 nitrate자화에 관계하는 유전자군(*nirA*, *crnA*, *niiA*, *niaD*)은 nitrogen에 의해 유도되어지며, 암모니움에의해 제어되어 진다고 생각되며 이러한 사실은 *A. nidulans*(21), *A. niger*(22) 및 *A. oryzae*(22)로부터 *niiA*, *niaD*의 유전자가 분리되면서 그 유전자군의 해석이 더욱더 용이하게 이루어 졌다. 그 결과 *niiA*, *niaD*의 발현은 *nirA*에 의해 조절되며, 같은 유전자군의 *crnA*는 *nirA*에 의해 발현이 조절되지 않고 *areA*에 의해 직접 조절되어 진다고 생각된다. 이러한 발현 조절계에서 *areA*, *creA*단백질은 많은 유전자군의 발현조절에 관여하므로 wide domain regulatory genes라고도 하며 일반적으로 *areA*단백질은 nitrogen metabolite repression에 관여하는 유전자로 알려져 있으며, *creA*단백질은 carbon catabolite repression에 관여한

Starch Response Element (SRE)

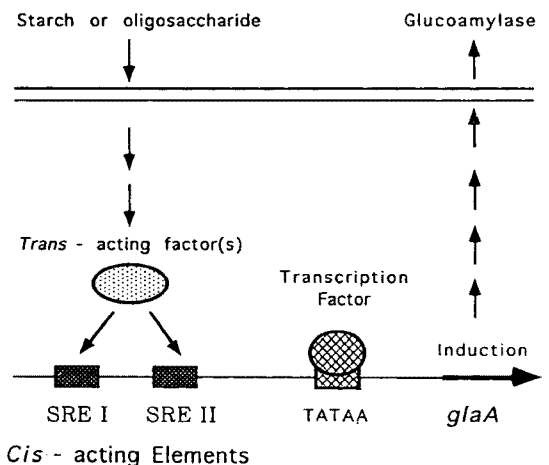


그림 4. A. oryzae의 glucoamylase유전자의 전사제어 system.

다고 알려져 있다. 최근 creA유전자가 *A. nidulans*(23)와 *A. niger*(24)에서 분리되어 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 특히 산업적으로 유용한 효소인 amylase, glucoamylase, α -glucosidase 등도 발현에 있어서 이러한 유전자적 조절을 받는다고 생각된다. 그리고 이러한 산업적으로 유용한 효소의 promoter 영역을 조사해 보면 일련의 상동성이 있는 부위가 보이는데 이 또한 전분(starch)에 의해 발현이 유도된다고 하여 이부위를 Starch Response Element(SRE)라고 부르며, *Aspergillus*속의 glucoamylase에서 그 모델이 정립 (그림 4)되고 있으며, 이러한 분자적 차원에서의 유전자적 해석을 통해 분비기작의 규명과 함께 산업적인 응용도 이루어 지고 있다.

*Aspergillus*속의 형질전환의 특징과 유용균주의 육종

*Aspergillus*속의 형질전환계의 특징

일반적으로 곰팡이의 경우 균체내에 도입되어진 외래 유전자는 그 자체로 존재하지 않고 숙주 염색체에 들어가게 된다. 이러한 숙주 염색체에 들어가는 형태는 homologous recombination, nonhomologous recombination, double crossover 등의 형태를 취하는 것으로 알려져 있다(그림 5). 효모의 경우는 homologous recombination에 의하여 외래 유전자가 숙주 염색체에 들어가며, 인간등 동물의 경우는 nonhomologous recombination에 의하여 재조합이 이루어 진다고 보고 있다(25). 곰팡이의 경우, 상동적, 비상동적인 재조합으로 숙주 염색체에 들어가는게 특징이다. 그렇기 때문에 Target gene이나 vector부위에 숙주 염색체와 상동성이 없는 경우에도 염색체내에 재조합 될 수가 있다. 하지만 숙주 염색체와 상동성이 있는 경우에도 상동적 재조합 뿐만 아니라 비상동적인 재조합도 일어나게 되며 이것을 random integration이라고 한다. 지금까지 곰팡이의 경우는 그 형질전환의 빈도가 $1\mu\text{g DNA}$ 당 10~20개로 그 빈도가 낮은 것으로 알려져 있는데 그 이유는 만약 그 숙주자체의 생명유지에 필수적인 유전자상에 외래유전자가 도입 되

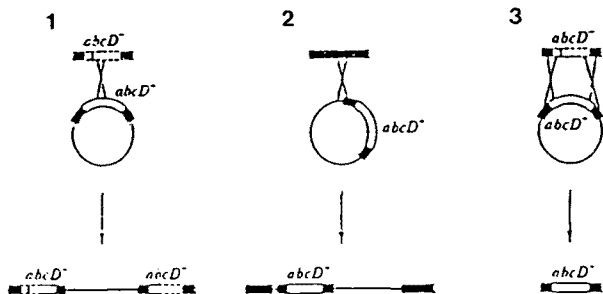


그림 5. 사상균에 의한 외래유전자의 숙주염색체로의 recombination type. 1. Homologous recombination; 2. Nonhomologous recombination; 3. Double crossover.

생물산업

표 3. *Aspergillus*속 형질전환에 사용되어지는 selection marker

Selection Marker	Coding gene	Origin
<i>argB</i>	Ornithine carbamoyltransferase (OTase)	<i>A. nidulans</i>
<i>PyrG</i>	Oronidine-5'-phosphate decarboxylase	<i>A. nidulans</i> & <i>A. oryzae</i>
<i>amdS</i>	Acetamidase	<i>A. nidulans</i> & <i>A. oryzae</i>
<i>niaD</i>	Nitrate reductase	<i>A. oryzae</i>
<i>met</i>	not detect	<i>A. oryzae</i>
<i>Leu</i>	not detect	<i>A. oryzae</i>

었을 경우 그 균의 생육이 없으며, 또한 selection marker를 이용한 경우(표 3)에 그 selection marker가 발현이 되어도 목적으로 하는 형질전환체가 얻어지기 힘들다고 생각되어진다. 한편 형질전환체가 얻어진다고 하더라도 외래유전자가 세포분열이 일어난 동안 소실 될 가능성이 있어 형질전환체의 성질이 소실되는 경우도 있다. *Aspergillus*속과 같은 실용균주를 형질전환법으로 육종을 할 경우 산업적으로 유용한 물질을 대량생산하기 위하여 영양배지를 많이 사용하는데 이와 같은 비 선택적 조건에서도 배양이 잘되며 그 도입된 형질의 안정성을 유지시켜주는 유리한 점이 있어 숙주로서 많이 선택되어지고 있다. 앞에서 언급한 바와 같이 곰팡이의 경우 도입된 외래 유전자가 여러장소에 많은수가 재조합 될 수가 있어 앞으로 유용효소의 유전자를 *Aspergillus*속에 도입할 경우 그 유전자의 증폭과 동시에 유용물질의 대량생산이 기대 되어지며, 이러한 유용균주의 육종이 성공한 예도 많이 있으며(26-28), 앞으로도 유용균주 육종의 숙주로서 기대 되어진다. 하지만 *Aspergillus*속의 경우 다른 미생물에 비하여 유전학적 연구가 미약하며 균사는 물론 분생자가 다핵이라는 문제점도 있다. 다핵의 경우 도입된 유전자가 어느 핵내에 도입되었는지 확인하기가 어려우며 처음 분리한 형질전환체는 heterocaryon이므로 계대하는 동안에 homocaryon을 분리하여야만 한다. 그 분리과정을 그림 6에 나타내었다. 한편 1983년 처음으로 *Aspergillus nidulans*를 숙주로 하여 형질전환을 시킨 보고 (29,30)가 발표된 이래, *Aspergillus*속 중 유전적인 성질이 조금 알려져 있으며 분생자가 단핵으로 되어있다는 이유로 *A. nidulans*, *A. niger*를 숙주로 많이 사용되어 지고 있다(29-40).

분자적 유용균주의 육종

산업적으로 주요한 위치를 차지 하고 있던 *Aspergillus*속의 유용균주 육종에는 지금까지 교배교잡, 변이체 처리, 자외선, X선의 처리 그리고 세포 융합법에 의하여 개량 되어 왔다. 그러나 교배교잡의 방법은 종과 종간의 범위의 제약이 있으며, 이러한 점은 세포융합의 발달과 함께 그 범위가 좀더 광범위하게 되었다.

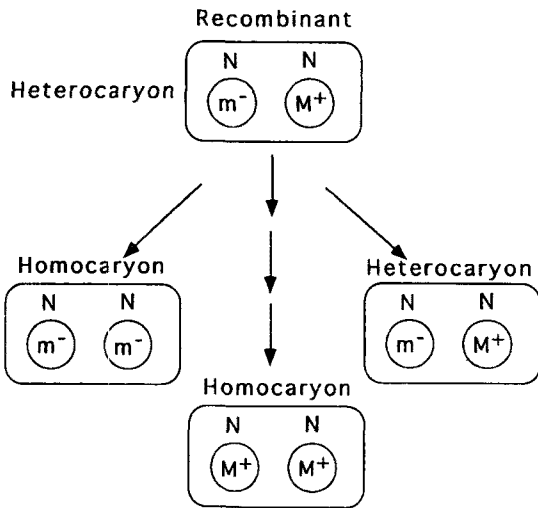


그림 6. 다핵 사상균의 형질 전환 모식도. N: 핵, M⁺: 정상유전자. m⁻: 변이유전자.

한편 1980년대에 들어오면서 유전자 조작기법의 발달에 의해 분자적인 차원에서 균주의 개량이 이루어지게 되었으며, 앞에서 언급한 바와 같이 단백질의 대량 분비 및 정확한 당수식등의 잇점에 의해 유용단백질의 대량생산에 숙주로서의 역할을 가지게 되었다. 예를 들어 산업적으로 유용한 α-amylase, glucoamylase 그리고 고부가가치의 식품 감미료산업에 유용한 α-glucosidase 등의 생산력을 Aspergillus속을 숙주로 해서 유전자를 증폭 시킴으로서 cost를 낮출뿐 아니라 많은 양의 유용단백질을 생산하고 있다. 또한 이러한 유전자의 강력한 발현을 위해 promotor부위도 강력한 promotor의 선정이 필요하며 Aspergillus속의 발현에는 지금까지 널리 알려진 α-amylase나 glucoamylase의 inducible promotor가 주로 사용되어진다(41).

이종단백질의 생산

지금까지 이종유전자의 발현에는 주로 대장균(E. coli)이 숙주로서 많이 사용되어져 왔다. 대장균은 외래 유전자를 높은 level로 전사 및 번역을 통상 가능하게 하지만, 한편으로 외래 유전자가 진핵세포 유래 일 때 대장균에서는 당수식이 일어나지 않고 단백질의 입체구조가 변환되는 경우, 그리고 inclusion body를 형성하는 경우가 많아 생물학적 활성이 있는 단백질의 대량생산은 어려운 실정이다. 일반적으로 숙주의 선택에는 경제적인 문제와 단백질의 성질을 고려해야 하는 것이 보통이다. 효모를 숙주로 하여 발현 시킬 경우, 당수식의 정확성과 그 발현량이 낮기 때문에 문제점이 많았다. 이러한 문제점을 고려하여 사상균 그 중에서도 Aspergillus속을 숙주로 하여 이종단백질을 발현 시킬려는 시도가 이루어졌으며, 미국의 Genencor사에서 A. nidulans를 숙주로 하여 치즈생산에 필요

표 4. Aspergillus속 으로부터 분비, 생산 되어진 이종단백질

단백질	숙주
bovine chymosin (42)	A. nidulans A. oryzae
human tissue plasminogen activator (45)	A. nidulans
human antitrypsin	A. nidulans
human lysozyme (46)	A. niger
human interleukin-6 (47)	A. nidulans
human lactoferrin (48)	A. oryzae
human interferon (49)	A. nidulans
pig phospholipase A2	A. niger
plant thaumatin	A. oryzae
mucor michi acidic protase	A. oryzae
mucor michi lipase	A. oryzae
E. coli enterotoxin	A. nidulans
E. coli aspartase (50)	A. nidulans
Cellulomonas fimi endoglucanase	A. nidulans

한 chymosin의 전구체인 prochymosin을 A. niger의 glucoamylase promotor에 연결하여 발현 분비 시켜 배양액 1 l당 2.5 mg의 단백질을 분배생산 시켰으며, 이것은 사상균을 이용하여 이종단백질을 분비 시킨 최초의 보고이다(42). 또한 Canada의 Allex사에서 human interferon-α2 및 Cellulomonas속의 Endo-Glucanase를 발현 시켰으며, 미국의 ZymoGenetics사는 human유래의 tPA(tissue plasminogen activator)를 발현시켰다(표 4). 하지만 그 발현량이 낮은 것으로 보아 A. nidulans자체가 분비능이 낮은 것으로 생각되어진다 (43). 한편 덴마크의 Novo사는 A. oryzae를 숙주로 해서 Mucor miehei의 acidic protease를 발현 시킨 결과, 배양액 1 l당 3.3 g의 단백질을 생산분비 하는데 성공하였다. 그리고 Humicola속의 alkali lipase역시 A. oryzae를 숙주로 해서 생산발현 시킨 후 제제산업에 이용하고 있다. 하지만 A. oryzae의 경우 자체 protease의 분비능이 높기 때문에 동물세포 유래의 이종단백질을 분비 생산할 경우 배양 후기에 배양액에 발현, 분비 되어진 이종 단백질이 숙주세포가 생산, 분비하는 protease에 의해 분해되어 그 양이 현저하게 저하 된다는 보고가 있다(44,45). 그러므로 발현 되어진 이종단백질이 A. oryzae의 protease에 의해 분해되기 쉬운 단점이 있어 배자상에 protease inhibitor 등을 첨가 하여 이러한 단점을 보완하고 있다. 한편 미국에서는 A. niger와 A. oryzae가 숙주로서의 안정성(generally regarded as safe : GRAS)로 인정을 받았으며 세계보건기구(WHO)도 같은 견해를 표명하고 있어 앞으로 Aspergillus속을 숙주로 해서 이종단백질의 대량 생산이 기대 되어진다. 또한 1995년 일본내에서 Aspergillus oryzae를 숙주로 하는 형질전환 system의 특허권을 놓고 Novo사와 Amamo 제약회사 사이의 법적인 분쟁이 일어난 것만 보아도 앞으로 곰팡이의 형질전환에 의한 균주개발이 Biotechnology분야에 중요한 부분을 차지 할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Ruttkowski, E. and Khanh, N. Q. (1991). Filamentous fungi as expression system for the industrial enzyme. *GIT Fachz. Lab.* **12**, 1309-1315.
2. Witteveen, C. F., van de Vondervoort, P., Swart, K. and Visser, J. (1990). Glucose Oxidase overproducing and negative mutants of *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 683-686.
3. Van Tieghem, P. (1867) Chimie vegetale; sur la fermentation gallique. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* **65**, 1091-1094.
4. Foster, J.W. (1949) Chemical activities of fungi. Academic Press, New York.
5. Rugsaseel, S., Morikawa, S., Kirimura, K. and Usami, S. (1995). Stimulation of citric acid production in *Aspergillus niger* by addition of viscous substances in shake culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**, 839-843.
6. Rawat, A.K. (1968) Some observations on the aspergillin of *Aspergillus niger*. *Arch. Biochem. Biophys.* **124**, 418-421.
7. Foster, J.W. (1949) *Chemical Activity of Fungi*. P251.
8. Cochrane, V.W. (1958) *Physiology of Fungi*. P300.
9. Roberg, M. (1928) Zentr. Bakt. Parasitenk. Abt. II, p333.
10. Raper, K.B. and Fennel, D.I. (1965) The genus *Aspergillus*, Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland.
11. Gams, W., Christensen, M., Onions, A.H., Pitt, J.I. and Samson, R.A. (1985) Infrageneric taxa of *Aspergillus*, In Advances in *Penicillium* and *Aspergillus* systematics (Samson, R.A. & Pitt, J.I. eds.), pp.55-62, Plenum Press, New York.
12. Sugiyama, J., Rahayu, Endang S., Chang, J.M. and Oyaizu, H. (1991) Ch- emotaxonomy of *Aspergillus* and associated telemorphs, *Proc. 34th Annu. Meet. Jpn. Soc. Med. Mycol., in press.*
13. Nealson, K.H. and Garber, E.D. (1967) An electrophoretic survey of esterases, phosphatase, and leucine amino-peptidases in mycelial extracts of species of *Aspergillus*. *Mycologia* **59**, 330-336.
14. Nasuno, S. (1971) Polyacrylamide gel disc electrophoresis of alkaline proteinases from *Aspergillus species*. *Agric. Biol. Chem.* **35**, 1147-1150.
15. Nasuno, S. (1972) Differentiation of *Aspergillus sojae* from *Aspergillus oryzae* by polyacrylamide gel disc electrophoresis. *J. Gen. Microbiol.* **71**, 29-33.
16. Nasuno, S. (1972) Electrophoretic studies of alkaline proteinases from *Aspergillus flavus* group. *Agric. Biol. Chem.* **36**, 684-689.
17. Nasuno, S. (1974) Further evidence on differentiation of *Aspergillus sojae* from *Aspergillus oryzae* by electrophoretic patterns of cellulase, pectinlyase, and acid proteinases. *Can. J. Microbiol.* **20**, 413-416.
18. Kurzeja, K.C. and Garber, E.D. (1973) A genetic study of electrophoretically variant extracellular amyolytic enzymes of wild type strains of *Aspergillus nidulans*. *Can. J. Genet. Cytol.* **15**, 275-387.
19. Kurtzman, C.P., Smiley, M.J., Robnett, C.J. and Wicklow, D.T. (1986) DNA relatedness among wild and domesticated species in the *Aspergillus flavus* group. *Mycologia* **78**, 955-959.
20. Kurtzman, C.P., Horn, B.W. and Hessltine, C.W. (1987) *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*, *Antonie van Leeuwenhoek*, **53**, 147-158.
21. Johnstone, I.L., McCabe, P.C., Greaves, P., Gurr, S.J., Cole, G.E., Brow, M.- A.D., Unkles, S.E., Clutterbuck, A.J., Kinghorn, J.R. and Innis, M.A. (1990) Isolation and characterisation of the *crnA-niaA-niaD* gene cluster for nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*. *Gene* **90**, 181-192.
22. Unkles, S.E., Campell, E.I., Punt, P.J., Hawker, K.L., Contreras, R., Hawkins, A.R., Van den Hondell, C.A.M.J.J. and Kinghorn, J.R. (1992) The *Aspergillus niger niaD* gene encoding nitrate reductase: upstream nucleotide and amino acid sequence comparisons. *Gene* **111**, 149-155.
23. Dowzer, C.E.A. and Kelly, J.M. (1991) Analysis of the *creA* gene, a regular of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell. Biol.* **11**. 5701-5709.
24. Drysdale, M.R., Kolze, S.E. and Kelly, J.M. (1993) The *Aspergillus niger* carbon catabolite repressor encoding gene, *creA*. *Gene* **130**, 241-245.
25. Gomi, K. and Kitamoto, K. (1991) Transformation system for *Aspergillus oryzae* and structure analysis of the α -amylase gene. *Cell Science* **7**, 229-239.
26. Christensen, T., Woeldike, H., Boel, E., Mortensen, S.B., Hjortshoej, K., Thim, L. and Hansen, M.T. (1988) High level expression of recombinant genes in *Aspergillus oryzae*. *Bio/Technology* **6**, 1419-1422.
27. Wittington, H., Kerry-Williams, S., Bidgood, K., Dodsworth, N., Pederdy, J., Dobson, M., Hinchliffe, E. and Ballance, D. J. (1990) Expression of the *Aspergillus niger* glucose oxidase gene in *A. niger*, *A. nidulans* and *S. cerevisiae*. *Curr. Genet.* **18**, 531-536.
28. Unkles, S.E., Campbell, E.I., De Ruiter-Jacobs, Y.M.J.T., Broekhuijsen M.P., Macro, J.A., Carrez, D., Contreras, R., Van den Hondel, C.A.M.J.J. and Kinghorn, J.R. (1989) The development of a homologous transformation system for *Aspergillus oryzae* based on the nitrate assimilation pathway: A convenient and general selection system for filamentous fungal transformation. *Mol. Gen. Genet.* **218**, 99-104.
29. Tilburn, J., Scazzocchio, C., Taylor, G.G., Zabicky-Zissman, J.H., Lockington, R.A. and Davies, R.W. (1983) Transformation by integration *Aspergillus nidulans*. *Gene* **26**, 205-221.
30. Ballance, D.J., Buxton, F.P. and Turner, G. (1983) Transformation of *Aspergillus nidulans* by the orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene of *Neurospora crassa*. *Biochem.*

- Biophys. Res. Commun.* **112**, 284-289.
31. Johnstone, I.L. (1985) Transformation of *Aspergillus nidulans*. *Microbiol. Sci.* **2**, 307-311.
 32. Yelton M.M., Hamer, J.E. and Timberlake, W.E. (1984) Transformation of *Aspergillus nidulans* using a *trpC* plasmid. *Processings of the national Academy of Sciences* **81**, 1370-1474.
 33. John, M.A. and Peberdy, J.F. (1984) Transformation of *Aspergillus nidulans* using the *argB* gene. *Enzyme Microbiology and technology* **6**, 386-389.
 34. Kelly, J.M. and Hynes, M.J (1985) Transformation of *Aspergillus niger* by the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans*. *EMBO journal* **4**, 475-479.
 35. van Gorcom, R.F.M., Pouwels, P.H., Goosen, T., Visser, J., Broek, H.W.J., Hamer, J.F., Timberlake, W.E. and Hondel, C.A.M.J.J. (1985) Expression of an Escherichia coli β -galactosidase fusion gene in *Aspergillus nidulans*. *Gene* **40**, 99-106.
 36. Johnstone, I.L., Hughes, S.G. and Clutterbuck, A.J. (1985) Cloning an *Aspergillus nidulans* developmental gene by transformation. *EMBO journal* **4**, 1307-1311.
 37. Wernars, K., Goosen, T. Sewart, K. and Broek, H.W.J. (1986) Genetic analysis of *Aspergillus nidulans* *ads*⁺ transformants. *Mol. Gen. Genet.* **205**, 312-317.
 38. Cullen, D. Leong, S.A. Wilson, L.J. and Henner, D.J. (1987) Transformation of *Aspergillus nidulans* with the hygromycin resistance gene, *hph*. *Gene* **57**, 21-26.
 39. Wernars, K., Goosen, T., Wennekes, B.M.J., Sewart, K., Van den Hondel, C. A.M.J.J. and Broek, H.W.J. (1987) Co-transformation of *Aspergillus nidulans*: a tool for replacing fungal genes. *Mol. Gen. Genet.* **209**, 71-77.
 40. Randy, M., Berka, K.H., Kodama, M.W. Rey, L.W. and Michael, W. (1991) The development of *Aspergillus niger* var. *awamori* as a host the expression and secretion of heterologous gene products. *Biochemical Society Transactions*, **19**, 681-685.
 41. Hata, Y. (1991) The glucoamylase encoding gene from *Aspergillus oryzae*. *J. Brew. Soc. Japan.* **86**, 829-839.
 42. Cullen, D., Gray, G.L., Wilson, L.J., Hayenga, K.J., Lamsa, M.H., Rey, M.W., Norton, S. and Berka, R.M. (1987) Controlled expression and secretion of bovine chymosin in *Aspergillus nidulans*. *Bio/Technology* **5**, 369-376.
 43. Gomi, K. (1991) Development of transformation system in filamentous fungi and its application. *Chem. Biol.* **28**, 91-100.
 44. Ward, M. (1991) More gene manipulations in fungi, *Academic press, New York*, P83.
 45. Upshall, A., Kumar, A.A., Bailey, M.C., Parker, M.D., Favreau, M.A., Lewison, K.P., Joseph, M.L., Maraganore, J.M. and McKnight, G.L. (1987) Secretion of active human tissue plasminogen activator from the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Bio/Technology* **5**, 1301-1304.
 46. Tsuchiya, K., Tada, S., Gomi, K., Kitamoto, K., Jigami, Y. and Tamura, G. (1992) High level expression of the synthetic human lysozyme gene in *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 109-114.
 47. Carrez, D., Janssens, W., Degrave, P., van den Hondel, C.A. M.J.J., Kinghorn, J. R., Fiers, W. and Contreras, R. (1990) Heterologous gene expression by filamentous fungi: secretion of human interleukin-6 by *Aspergillus nidulans*. *Gene* **94**, 147-154.
 48. Ward, P.W., Lo, J.Y. and Conneely, O.M. (1992) Production of biological active recombinant human lactoferrin in *Aspergillus oryzae*. *Bio/Technology* **13**, 498-530.
 49. Gwynne, D.I., Buxton, F.P., Williams, S.A., Garven, S. and Davies, R.W. (1987) Genetically engineered secretion of active human interferon and a bacterial endoglucanase from *Aspergillus nidulans*. *Bio/Technology* **5**, 713- 717.
 50. Hunter, G.D., Baily, C.R. and Arst, H.N. (1992) Expression of a bacterial aspartate gene in *Aspergillus nidulans*: an efficient system for selecting multicopy transformants. *Curr. Genet.* **22**, 377-383.