

## 제조합 *Aspergillus niger*에 의한 글루콘산나트륨의 산업적 생산

<sup>1</sup>이 선 희 · 이 현 철 · <sup>2</sup>김 대 혁 · <sup>2</sup>양 문 식 · † 정 봉 우

전북대학교 화학공학부, <sup>1</sup>식품공학과, <sup>2</sup>생물과학부

(접수 : 1998. 2. 2., 게재승인 : 1998. 3. 30.)

## Overproduction of Sodium Gluconate Using the Recombinant *Aspergillus niger*

Sun-Hee Lee<sup>1</sup>, Hyun-Chul Lee, Dae-Hyuk Kim<sup>2</sup>, Moon-Sik Yang<sup>2</sup>, and Bong-Woo Chung<sup>†</sup>

Department of Chemical Engineering and Technology,

<sup>1</sup>Department of Food Engineering

<sup>2</sup>Faculty of Biological Sciences, Chonbuk National University, Chonju, 561-756, Korea

(Received : 1998. 2. 2., Accepted : 1998. 3. 30.)

Polymerase chain reaction(PCR) was conducted to obtain the gene encoding glucose oxidase(GOD) from *Aspergillus niger*(ATCC 2119) and the DNA sequence determined was coincided with published GOD sequence from *A. niger*. Recombinant transforming vector containing GOD and hygromycin B(hyg.B) resistant gene(*hph*) was constructed and used for further transformation of *A. niger* ATCC 2119. Selectivity of hyg.B against *A. niger* differed depending on which media were used *i.e.*, nutrient-rich media such as potato dextrose agar(PDA) and complete medium(CM) showed only 50% growth inhibition at 400  $\mu\text{g ml}^{-1}$  of hyg.B while the minimal media inhibited mycelial growth completely at 200  $\mu\text{g ml}^{-1}$  of hyg.B. Twenty to sixty putative transformants were isolated from the hyg.B-containing minimal top agar, transferred successively onto alternating selective and nonselective media for a mitotic stability of hyg.B resistance and, then, single-spored. Among the stable transformants, the transformant(tGOD1-6) grown by flask culture showed the considerable increase of extracellular GOD activity, which was estimated to the degree of 50% - 100% comparing to that of wild type. Transformation of tGOD1-6 was resulted from integration of the vectors into heterologous as well as homologous regions of the *A. niger* genome. Southern blot analysis revealed that there were two independent integrations of vector into fungal genome and one into the GOD gene due to homologous recombination. In addition, GOD activity and sodium gluconate production when tGOD1-6 was fed-batch fermented were enhanced 11 fold and 2.25 fold, respectively, compared to that of the wild type.

Key Words: *Aspergillus niger*, Batch Fermentation, Glucose Oxidase, Sodium Gluconate

### 서 론

글루콘산 및 그 유도체는 다양한 물성을 지니고 있어 의약품, 식품 및 화학공업의 기초원료로 다양하게 이용되고 있다. 글루콘산 유도체의 산업적인 생산방법은 전기화학적 산화방법(1), 촉매산화법(2), 미생물을 이용한 발효법(3, 4), 고정화효소를 이용한 방법(5, 6) 등의 크게 4가지의 포도당 산화방법 중 하나를 따르는데, 경제적인 요인 때문에 현재는 미생물을 이용한 생산방법이 산업적으로 가장 많이 이용되고 있다. 포도당 산화를 통한 글루콘산 유도체의 생산이 산업적으로 가능한 미생물로는 포

도당산화효소의 형성 능력에 따라 *Aspergillus* 및 *Penicillium* 속이 제시되었으며(7), 현재는 *A. niger*를 이용한 액침 배양방식에 의해 글루콘산을 생산하고 있다.

포도당산화효소( $\beta$ -D-glucose : oxygen 1-oxidoreductase, E.C. 1.1.3.4)는 산소 존재하에서 포도당을 glucono- $\delta$ -lactone으로 산화시키고, 과산화수소를 생성하는 효소이다 ( $\beta$ -D-glucose + O<sub>2</sub> → glucono- $\delta$ -lactone + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). 포도당산화효소는 포도당만을 특이적으로 산화시키기 때문에 여러 용액으로부터 포도당을 정량하거나 포도당 biosensor의 제조에 이용되며, 식품 중의 포도당이나 산소 제거와 함께 과산화수소 발생에 의한 식품의 저장등에 활용된다. 또한 포도당의 산화에 의한 글루콘산 및 그 유도체와 glucono- $\delta$ -lactone 생산에 이용되고 있다(8). *A. niger*로부터 얻어진 포도당산화효소는 순수 분리 정제되어 150 kDa인 dimer로 밝혀졌으며 두 개의 FAD cofactor를 함유하는 것으로 알려져 있다(9). 이 효소의 유전자 또한 Frederick 등(10)에 의해 *A. niger*의 cDNA library로부터

† Corresponding Author : Department of Chemical Engineering and Technology, Chonbuk National University, Chonju, 561-756, Korea

Tel : 0652-270-2309, Fax : 0652-270-2306

e-mail : bwchung@moak.chonbuk.ac.kr

cloning 되었다.

진핵 세포로 구성된 사상성진균인 *A. niger*는 오랜 응용의 역사와 함께 안전한 미생물로[Generally Regarded As Safe (GRAS) organism], 폭넓은 대사과정과 분비능력을 이용하여 다양한 1차 또는 2차 대사물질과 함께 산업용 효소의 생산에 널리 사용되어 왔으며 최근 유전공학 기술의 획기적인 발달로 형질전환을 통한 유전자 도입방법으로 균주의 분자육종을 실시하여 기존 유용물질의 대량생산 및 외래 유용물질 생산의 주요한 target organism으로 각광받고 있다. 현재 이러한 유전자조작을 통한 재조합효소의 경우 chymosin과 glucoamylase의 생산이 보고 되었고(11,12) lysozyme(13) 그리고 arabinase, arabinofuranosidase, esterase(14)등의 대량발현에 대한 연구가 보고되고 있다.

따라서 본 연구에서는 포도당산화효소의 유전자를 *A. niger*로부터 분리, 재조합하여 특성화한 후 야생형 균주를 형질전환시킨 재조합 *A. niger*로부터 본 연구자 등에 의해 이미 제시된 글루콘산 및 그 유도체의 생산조건에 관한 기초연구(15)를 이용하여 포도당산화효소의 생산 증가를 통한 글루콘산나트륨의 산업적 대량 생산에 대하여 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주 및 plasmid

본 연구에서 형질전환 및 유전자분리에 *Aspergillus niger* (ATCC 2119)를 사용하였다. 유전자의 cloning 및 재조합 유전자의 제조는 Sambrook등(16)의 방법에 따르며, 이용된 plasmid는 pGEMT vector와 pUC18을 사용하였다. Plasmid 증식 및 보존을 위하여 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ 를 이용하였다.

### *A. niger*로부터 포도당 산화효소의 클로닝

이미 알려진 포도당산화효소의 염기서열(10)을 바탕으로 computer program을 이용하여 polymerase chain reaction(PCR)의 5' primer(5'GAATTCGGTATTCTCGGCATG-3')와 3' primer(TCTAGACAGCATCTAAGTACCATCCCC-3')를 합성하여 사용하였다. PCR에 의하여 클로닝된 유전자의 염기서열 결정은 dideoxynucleotide chain termination 방법(17)에 의하여 수행하였다. 염기서열 결정효율을 증진시키기 위하여 Henikoff(18)의 방법에 따라서 unidirectional deletion을 유도한다.

### 재조합 유전자의 제조

염색체내 유전자 수(copy number)의 증가를 위하여 제조된 유전자 운반체는 PCR에 의해 cloning된 promoter와 terminator를 포함하는 포도당산화효소 유전자(*God*)와 형질전환체의 선발을 위한 hygromycin B 저항성 유전자(hygromycin B resistance gene: *hph*)를 포함하도록 제조하였다.

### *A. niger*에 재조합 유전자의 도입

*A. niger*의 형질전환은 Kim 등(19)의 방법에 따라 수행하였다. *A. niger* 포자를 complete media에서 24시간 배양한 후 얻은 어린 균사체로부터 원형질체를 분리하여 Ca<sup>++</sup>와 polyethylene glycol(PEG) 등을 이용하여 형질전환을 유도하였다. 형질전환체는 hygromycin B가 포함된 선별배지에서 선발하였다. 유

전자 운반체에 의한 재조합 *God*의 도입은 형질전환체로부터 DNA를 분리하여 DNA-DNA hybridization을 이용하는 Southern analysis를 통해 확인하였다(16).

### Gluconic acid 발효

발효를 위한 seed culture용 배지로는 LM 배지를 사용하였고, 효소생산 및 배지조성 최적화를 위한 기본 배지는 modified LM 배지(M-LM)를 이용하였다(Table 1). 재조합 *A. niger*를 peptone이 함유된 M-LM 배지에서 30°C, 100 rpm 조건으로 shaking incubator에서 12-18 시간 전 배양을 실시한 후 LM 배지 1L당 전배양액 10%를 접종하여 2L fermentor에서 100 rpm, 1.5 vvm으로 배양하였다. 건조균체의 무게(dry cell weight)는 4000 rpm에서 30분 동안 원심분리하고 상등액을 제거한 후 얻은 균체를 3회 세척하여 105°C로 유지된 건조기에서 24시간 건조하면서 무게를 측정하여 시간에 따른 무게가 항량일 때 균체의 무게로 하였다.

Table 1. Composition of LM and M-LM media.

Component	Concentration(g/L)	
	LM	M-LM
corn steep liquor (CSL)	20	20
CaCO <sub>3</sub>	5	-
Glucose	60	60
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5	1.5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5	0.5
MgSO <sub>4</sub>	1	1
NH <sub>4</sub> Cl	5	5
peptone	-	30

### 효소의 역가측정

포도당산화효소의 역가 검정은 Sigma사의 assay manual에 의하여 측정하였다(7). 표준품으로는 *A. niger* 포도당산화효소(Sigma, type 5)를 사용하였으며 1 unit는 35°C pH 5.1의 조건에서 1분 동안 1  $\mu$ mol의 glucose를 산화시키는 효소의 양으로 정하였다. 배양액의 당정량은 Shaffer-Somogi(20) 방법에 의해 정량 하였다.

### 포도당 산화효소를 이용한 sodium gluconate의 제조

효소를 이용한 sodium gluconate의 제조공정은 회분식공정 장치를 이용하였다. 반응이 진행됨에 따라 gluconic acid가 생성되며 이때 NaOH액을 이용하여 pH 5.6(pH-stat) 조절하면서 36시간 동안 진행시켰다.

## 결과 및 고찰

### 포도당산화효소 유전자(*God*)의 cloning

유전자의 염기 서열을 바탕으로 PCR을 통해 증폭된 2.4kb 크기의 유전자 절편을 pGEM-T vector에 cloning하였다. *God*의 염기배열을 sequencing을 통해 확인한 결과 본 실험에 사용된 *A. niger*(ATCC 2119) 균주의 염기 서열은 *A. niger*(ATCC 9029)에서 발표된 포도당산화효소 유전자 염기 서열과

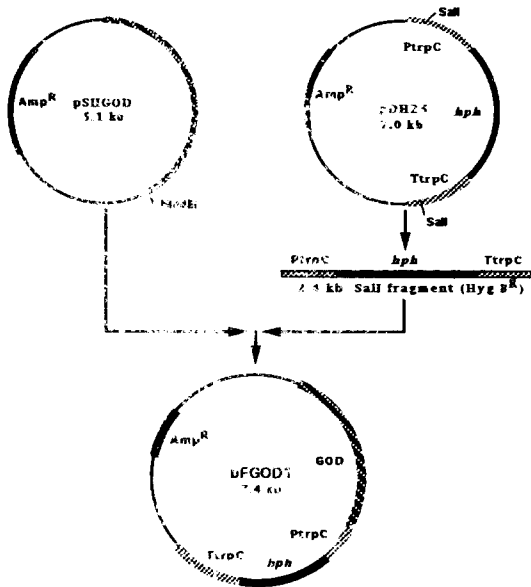


Figure 1. Schematic diagram of construction of pGOD1. *God* amplified with PCR was cloned into pGEM-T vector and then *SalI*-digested 2.4kb fragment of pDH25 containing *hph* cassette was ligated into *HindIII* site of pGEM-T vector through blunt end ligation.

일치함을 확인하였다(10). *God* 유전자는 ATG start codon 앞의 485bp의 promoter 부위와 포도당산화효소의 분비를 유도하는 22개의 아미노산으로 구성된 leader peptide 및 총 583개의 구조 아미노산과 terminator 부위를 포함하고 있었다. 형질전환체의 선발을 위한 hygromycin B 저항성 유전자(*hph*)는 *Aspergillus nidulans*의 *trpC* 유전자의 promoter와 terminator에 의해 발현이 유도되도록 제조된 cassette를 pDH25로부터 획득하였다(11). 재조합 운반체의 제조는 Figure 1과 같다.

#### *A. niger*의 형질전환체의 선발 및 확보

형질전환체의 선발을 위하여 항생제 hygromycin B의 선발능력을 검증한 결과 영양원이 풍부한 potato dextrose agar(PDA)와 complete agar의 경우 400 µg hygromycin B/mL의 농도에서 균사 성장이 50%가 억제되었으나, 영양원이 적은 minimal agar에서는 200 µg hygromycin B/mL의 농도에서 균사생장이 완전히 억제되었다. 또한 포자의 발아능력은 사용한 배지와는 상관없이 200 µg hygromycin B/mL의 농도에서 발아가 억제되었다. 따라서 형질전환 후 재조합 형질전환체의 선발을 위해 최종 농도가 200 µg hygromycin B/mL의 최소배지를 top agar로 사용하였고 단포자 분리는 200 µg hygromycin B/mL의 최소배지에 포자를 도말한 후 발아한 개체를 획득하였다. 본 실험의 최소배지에서 사용된 항생제 hygromycin B의 선발농도는 Mohr와 Esser(21) 및 Punt 등(22)의 경우 등에서 보다 높은 농도를 요구하는데, 이는 형질전환에 이용되는 *Aspergillus* 종간 뿐 아니라 *A. niger*의 균주간에도 hygromycin B에 대한 감수성의 차이에 의한 것으로 생각된다. 1차 선발된 *A. niger*의 형질전환체는 hygromycin B를 포함하는 선택배지와 hygromycin B를 포함하지 않는 일반배지에서 번갈아 계대배양하여 안

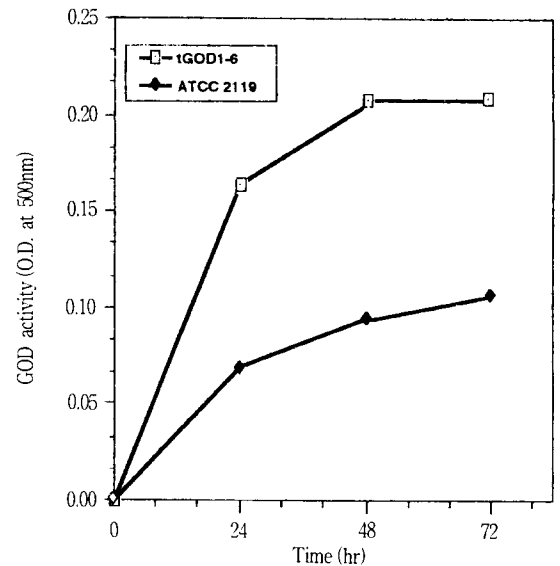


Figure 2. Comparison of extracellular glucose oxidase production by the wild type (◆) and the recombinant (□) strain of *A. niger*.

정화 시켰다. 최종적인 형질전환 효율은 형질전환 시도당 최소 20개의 형질전환체를 획득 하였다. 재조합 *A. niger*로부터의 효소생산 능력을 150 mL의 flask 배양을 통해 1차 검색하여 10개의 형질전환체를 선발 하였으며, 이중 형질전환체(tGOD1-6)는 wild type에 비해 배양시간과 조건에 관계없이 2배 이상의 효소생산 능력을 나타냈다(Figure 2). 본 실험에서 재조합 균주를 이용한 포도당산화효소의 증가효과는 Whittington 등(23)의 경우 6배증대의 효과 보다 낮은 경우로 나타 났으나, 이는 본 실험에서 사용된 *God* 유전자의 발현을 조절하는 promoter 부위가 완전하지 않기 때문이라 생각되어 진다.

#### Southern analysis

형질전환체(tGOD1-6)로부터 DNA를 분리하여 *God* 유전자내에 인식부위를 갖지않는 제한효소 *SphI*과 하나의 인식부위를 갖는 *PstI*을 이용하여 자른 후 방사성 동위원소로 표지된 *God*을 probe로 사용하여 형질전환을 통해 증가된 포도당산화효소 유전자(*God*) 수(copy number)를 확인 하였다. *SphI*에 의한 hybridization결과 wild type *A. niger*는 23kb 크기의 하나의 band만을 함유하며 *PstI*의 결과 2.8kb와 1.8kb 두 개의 band를 나타냄으로 wild type *A. niger*의 염색체내에 존재하는 포도당산화효소 유전자는 하나임을 알 수 있었다. 형질전환체(tGOD1-6)에서는 *SphI*의 hybridization결과 22kb, 8.0kb, 3.8kb의 3개의 hybridizing band를 알수 있었으며 따라서 형질전환을 통해 증가된 *God* 유전자의 수는 2개 이상 이었다. 또한 *PstI*의 결과 tGOD1-6에서는 wild type에서 존재하는 2.8kb band가 존재하지 않으므로 도입되는 포도당산화효소 유전자와 *A. niger* 염색체에 존재하는 포도당산화효소 유전자의 상동 부위간의 재조합(homologous recombination)에 의한 유전자의 변이도 발견 되었으며, 이는 *SphI*에 의한 hybridization 결과 각각의 균주에서 보았던 23kb와 22kb의 차이가 실제 서로 다른 유전자 구조에 의한것임을 확인 할 수 있었다. 이와 같은 targeted recombination은

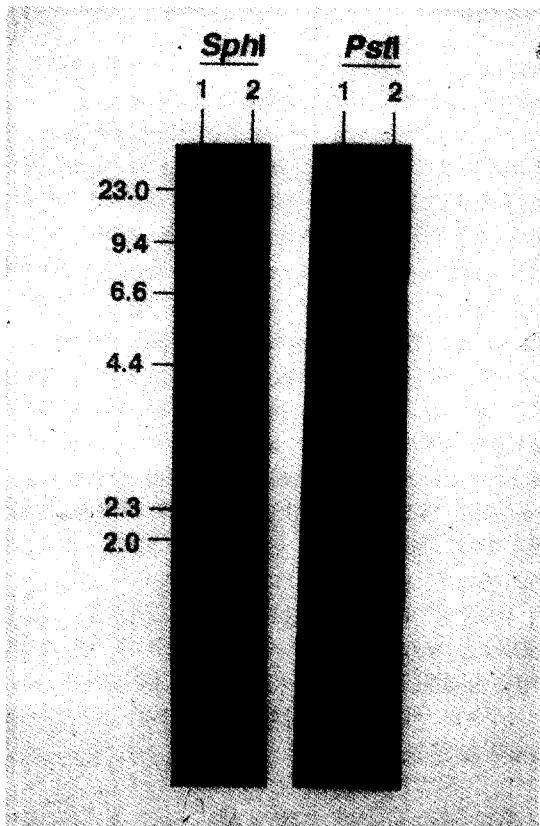


Figure 3. Southern blot analysis of transformant(tGOD1-6). Lanes 1 and 2 contain DNA from the wild type(ATCC 2119) and the transformant(tGOD1-6), respectively. Restriction enzymes are indicated at the top and numbers on left represent the fragment sizes in kb.

형질전환을 이용한 *God* 유전자의 돌연변이 및 치환 등에 이용되어 *A. niger*로부터 글루콘산 이외의 유용 유기산의 순수분리에 도움이 되는 균주 육종에 이용되리라 기대된다(Figure 3)(24).

**Batch-fermentation**

본 배양을 위한 최적 transfer시간을 결정하고자 LM배지에서 seed용 균주를 배양한 결과 접종 후 18시간 정도가 late exponential phase로 본배양 접종의 최적 시기로 결정하여 사용하였다.

2L fermentor에서 LM 배지로 기존 wild type *A. niger* (ATCC 2119)와 recombinant *A. niger*(tGOD1-6)를 배양함으로써 효소역가 및 growth pattern을 확인하였다(Figure 4). Wild type *A. niger*는 접종 후 약30시간까지 효소의 활성이 증가하다 감소하기 시작 하였으나(Figure 4A), tGOD1-6는 접종 후 18시간에서 배지내 효소의 활성이 가장 높았으며(Figure 4B) 이는 wild type과 비교하여 2배 이상이었다. 비교된 두 균주 모두에서 배지내 효소활성이 최고에 이른 후 급격히 감소하였는데 이와 같은 원인으로는 DO limitation에 의한 intracellular proteolysis의 증가와 포도당 산화효소에 의해 glucose에서 생성된 glucono- $\delta$ -lactone으로부터 비효소적으로 발생하는 gluconic acid에 의한 pH stress(<pH 4.0)로 인해 죽은 세

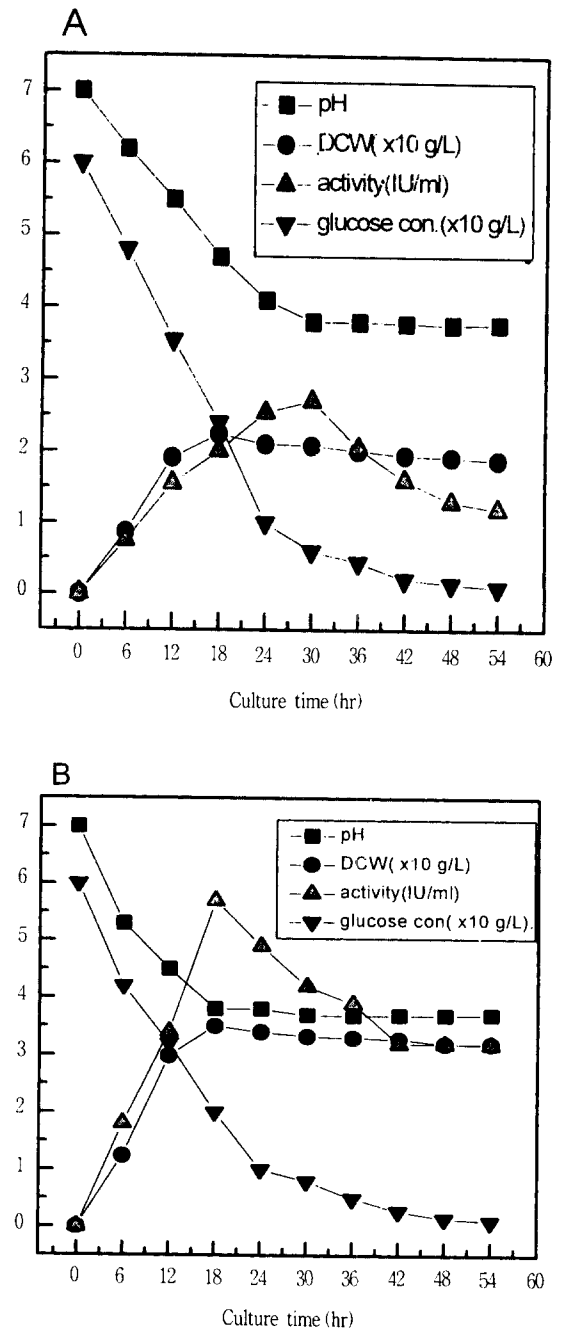


Figure 4. Comparison of batch fermentation time courses by *A. niger* ATCC 2119 (A) and tGOD1-6 (B).

포에서 유래된 protease가 이미 생성된 포도당산화효소를 파괴해 일어나는 결과로 사료된다(25).

**Fed-batch culture**

고농도 배양을 통한 효소 역가의 향상을 위하여 wild type과 recombinant type, tGOD1-6,에 대하여 feeding 방법이 비교적 간단한 feeding strategy인 pH-stat로 fed-batch culture를 실시 하였다. 사용된 염기로는 3N NaOH 수용액을 사용하며, pH 5.6으로 조절되면서 자동적으로 feeding이 되도록 하였고, 배지는 M-LM을 이용 하였다. Fed-batch culture의 결과 재조합

요 약

균체에서 wild type에 비해 약 11배의 효소 역가 향상을 이루었다(Table 2). 이같은 원인으로서는 wild type의 균주는 배양방법에 따라 균주 성장에 별차이를 보이지 않았으나 tGOD1-6의 경우 배양방법에 관계없이 wild type에 비해 균주의 성장이 월등하였으며, 또한 fed-batch fermentation에서 batch fermentation보다 3배 이상의 균사 성장률을 나타내었다. 이는 tGOD1-6의 경우 다양한 종류의 형질전환체중에 빠르게 자라는 Type I colony(diameter 5-6mm after 5 day in hygromycin B containing media)(21)에 속하며 형질전환 과정에서 생긴 또다른 돌연변이에 의해 tGOD1-6의 균사성장율이 feeding medium의 공급과, DO limitation이 배제된 원활한 air의 공급 등에 보다 원활히 반응하여 균주의 활성이 크게 증가했기 때문이라고 사료되어 본 재조합 균주의 성장 및 생리활성에 대해 다양한 요인들을 비교하여 조사중이다. 포도당산화효소를 이용한 glucose의 gluconic acid로의 전환 및 sodium glucoate의 제조는 2L 발효조로부터 생산한 효소를 이용하여 초기 포도당의 농도를 60 g/L (w/v)로 할 경우에 재조합 균체에서는 36시간에 50.3 g/L sodium gluconate의 농도를 얻어 기존 wild type의 생산량인 22.5 g/L와 비교해 2.23배의 높은 sodium gluconate를 제조할 수 있었다(Figure 5).

*Aspergillus niger*(ATCC 2119)로 부터 polymerase chain reaction을 이용하여 포도당산화효소의 유전자를 증폭하여 cloning 한 후 염기 서열을 결정하여 보고된 포도당산화효소의 유전자 염기서열과 일치함을 확인 하였다. *A. niger*에 형질전환을 위한 재조합 유전자 운반체는 항생제 hygromycin B에 저항성을 나타내는 유전자와 포도당산화효소 유전자를 합하여 제조하였다. 항생제 hygromycin B의 *A. niger*에 대한 선발능력은 배지의 종류에 따라서 다를 수 있었는데, 영양원이 풍부한 potato dextrose agar(PDA)나 complete media(CM) 배지에서는 배지 mL당 400  $\mu$ g의 hygromycin B가 필요 하였으나, 최소배지의 경우는 200  $\mu$ g의 hygromycin B만으로 균사의 성장을 완전히 억제하였다. 1회 실험당 20 - 60개의 가능한 형질전환체를 획득하여 hygromycin B를 포함하는 선택배지와 일반배지에서 번갈아 배양하여 형질전환체를 안정화 하였으며 단포자분리를 실시하여 각각의 형질전환체를 확보하였다. 확보한 형질전환체중 tGOD1-6은 flask 배양에서 야생형에 비해 50% 에서 100% 이상의 포도당산화효소의 발현을 나타내었으며 형질전환체 tGOD1-6은 재조합 유전자가 염색체의 최소 두곳에 삽입되었음을 알 수 있었다. 형질전환체 tGOD1-6을 유가배양을 실시한 결과 야생형에 비해 포도당산화효소는 11배 글루콘산나트륨은 2.25배의 높은 효율을 보였다.

감 사

본 연구는 1996년도 교육부 학술연구조성비(생물화학공학:D-9)에 의해 연구되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Isbell, H. S., H. L. Frush, and F. J. Bates (1932), Manufacture of calcium gluconate by electrolytic oxidation of dextrose, *Ind. Eng. Chem.*, **24**, 375-378.
2. De Wilt, H. G. J. (1972), Oxidation of glucose oxidase to gluconic acid, *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.*, **11**, 370-378.
3. Kellin, D. and E. F. Hartree (1948), Production of organic acids by production, *J. Biochem.*, **42**, 221-337.
4. Yamata, K. (1976), Production of organic acids by fermentation, *Fermentation and Industry (Japan)*, **34**, 661
5. Hartmeier, W. and G. Tegge (1979), Glucose oxidation by modified mould mycelium, *Starch/Staerke*, **31**, 348-353.
6. Richt, G. and H. Heineckert (1979), Conversion of glucose into gluconic acid by means immobilized glucose oxidase, *Starch/Staerke*, **31**, 418-422.
7. Fiedurek, J., Z. Ilczuk, and A. Leonowicz (1986), Screening and mutagenesis of moulds for the improvement of glucose oxidase production, *Enzyme Microbe Technol.*, **8**, 734-736.
8. Pazur, J. and K. Kleppe (1964), The oxidation of glucose and related compounds by glucose oxidase from *Asper-*

Table 2. Summaries of improved glucose oxidase production by the transformant, tGOD1-6, from different culture types.

Strain	Culture type	DCW(g/L)	Activity(IU/ml)
Wild type	Batch type	23.4	2.7
	Fed-batch type	21.9	1.9
tGOD1-6	Batch type	34.1	5.8
	Fed-batch type	105.7	23.8

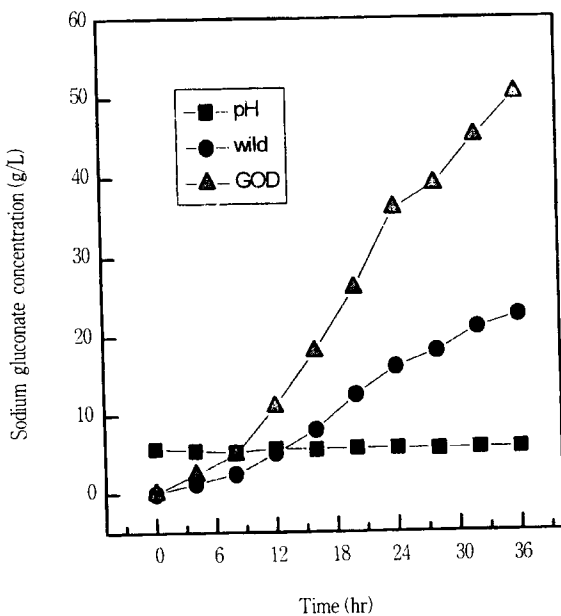


Figure 5. Comparison of fed-batch fermentation time courses by *A. niger* ATCC 2119 and tGOD1-6.

- gillus niger*, *Biochem.*, **3**, 578-583.
9. Frederick, K., J. Tung, R. Emerick, F. Masiarz, S. Chamberlain, A. Vasavada, and S. Rosenberg (1990), Glucose oxidase from *Aspergillus niger*, *J. Biol. Chem.*, **256**, 3793-3802.
  10. Richter, G. (1983), Glucose oxidase in Industrial Enzymology, Godfrey, T. and Reichelt, J. eds. MacMillan, N. Y. pp 428-436.
  11. Cullen, D., S. A. Leung, L. J. Wilson, and D. J. Henner (1987), Transformation of *Aspergillus nidulans* with the hygromycin-resistance gene, hph., *Gene*, **57**, 21-26.
  12. Schrickx, J. M., A. S. Krave, J. C. Verdoes, C. A. van den Hondel, A. H. Stouthamer, and H. W. Versveld (1993), Growth and product formation in chemostat and recycling cultures by *Aspergillus niger* N402 and a glucoamylase overproducing transformant, provided with multiple copies of the glaA gene, *J. Gen. Microbiol.*, **139**, 2801-2810.
  13. Archer, D. B., D. J. Jeenes, D. A. MacKenzie, G. Brightwell, N. Lambert, G. Lowe, S. E. Radford, and C. M. Dobson (1990), Hen Egg white lysozyme expressed in, and secreted from, *Aspergillus niger* is correctly processed and folded, *Biotechnology*, **8**, 741-745.
  14. Kroon, P. A., and G. Williamson (1996), Release of ferulic acid from sugar-beet pulp by using arabinase, arabinofuranosidase and an esterase from *Aspergillus niger*, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **23**, 263-267.
  15. 이현철, 정봉우, 김춘영, 김대혁, 나병국 (1996), *Aspergillus niger*를 이용한 글루콘산나트륨의 생산, *한국생물공학회지*, **11**, 270-275.
  16. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis (1989), Molecular cloning. A laboratory Manual. 2nd edit. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.
  17. Sanger, F., and S. Nicklen (1977), DNA sequencing with chain terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A* **74**, 5463-5467.
  18. Henikoff, S. (1984), Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing, *Gene*, **28**, 351-356.
  19. Kim, D. H., D. Rigling, L. Zhang, and N. K. Van Alfen (1995), A new extracellular laccase of *Cryphonectria parasitica* is revealed by deletion of LacA, *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **8**, 259-266.
  20. Holowitz, W. (1975), *Methods of Analysis of A.O.A.C.*, p 574.
  21. Mohr, G. and K. Esser (1990), Improved transformation frequency and heterologous promoter recognition in *Aspergillus niger*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **34**, 63-70.
  22. Punt, P. J., R. P. Oliver, M. A. Dingemans, P. H. Pouwels, and C. A. M. J. J. van den Hondel (1987), Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*, *Gene*, **56**, 117-124.
  23. Whittington, H., S. Kerry-Williams, K. Bidgood, N. Dods-worth, J. Peberdy, M. Dobson, E. Hinchliffe, and D. J. Ballance (1990), Expression of the *Aspergillus niger* glucose oxidase gene in *A. niger*, *A. nidulans* and *Saccharomyces cerevisiae*, *Curr. Genet.*, **18**, 531-536.
  24. Witteveen, C. F. B., P. van de Vondervoort, K. Swart, and J. Visser (1990), Glucose oxidase overproducing and negative mutants of *Aspergillus niger*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **33**, 683-686.
  25. Zetelaki, K. Z (1970), The role of aeration and agitation in the production of glucose oxidase in submerged culture II, *Biotechnol. Bioeng.*, **12**, 379-397.