

한국산 *Rhizopus*의 효소활성에 관한 연구 (第 1 報)

—Amylase, protease 및 cellulase 활성에 관하여—

李永祿 · 尹京河 · 李平佑 · 裴光星 · 朴龍根 · 鄭晟均 · *徐恒源

(고려대학교 · 생물학과 · *태평양화학)

Studies on the Enzyme Activities of *Rhizopus*
distributed in South Korea(1)

—On the amylase, protease and cellulase activities—

LEE, Yung Nok, Kyung Ha YOON, Pyung Woo LEE, Kwang Seung BAE,
Yong Keun PARK, Sung Kyun CHUNG and *Hang Won SUH.

(Dept of Biology, Korea University · *Pacific Chemical Co.)

ABSTRACT

Enzyme activities, such as glucoamylase, dextrinogenic amylase, cellulase, acid protease and neutral protease, of *Rhizopus* isolated from various substrates collected throughout South Korea are measured, and their enzyme activities are surveyed from taxonomical, ecological and physiological viewpoint. Effect of carbon sources and phytohormones on the amylase production of *Rhizopus* are also measured.

Among the 735 strains of *Rhizopus* isolated, strain number 587 exhibiting most prominent dextrinogenic amylase and neutral protease activity is selected as the best strain, and the strain number 673, 108, 329, 165 and 728 are selected for their predominant cellulase, acid protease, glucoamylase, dextrinogenic amylase and neutral protease activities, respectively.

R. acidus and *R. japonicus* exhibited higher dextrinogenic amylase and glucoamylase activities, while *R. nigricans* which exhibited relatively higher cellulase activity, showed lower activities for both amylase. *R. tritici* exhibited higher protease activity. The relations between activities and various substrates of wild strains are not outstanding difference, although the strains isolated from inland region exhibited more or less higher amylase and cellulase activities, than those of coast region, generally.

Lactose and dextrin are most effective carbon sources for glucoamylase and dextrinogenic amylase production of the *Rhizopus niveus*, respectively. Although all phytohormones tested are effective for production of amylase by the *Rhizopus* strains, except nicotinamide for glucoamylase production, biotin and ascorbate are most effective for dextrinogenic amylase and glucoamylase production, respectively.

서 론

Fukumoto(1943, 1944) 등에 의한 bacterial amylase에 관한 집중적 연구로부터 출

발한 효소생성 균주에 관한 생물학적 연구는 진균류와 같은 다른 미생물군에도 확대되어 이제 여러가지 종류의 균주가 효소공업에 활용되기에 이르렀다. *Rhizopus* 속의 효소

* 이 연구는 태평양화학의 연구조성비의 도움을 받았다.

생성능에 관해서는 Phillips & Caldwell (1951) 및 Cleveland & Katzbeck (1951) 등에 의한 glucoamylase의 발견에 이어 Wang & Hesseltine (1965), Lin (1972) 등은 protease의 생성을 확인하였고 Imada *et al.* (1962) 및 Takahara *et al.* (1964) 등은 cellulase의 생성을 보고하고 있다. 효소의 수요는 발효공업, 방직공업, 식품 및 의약품 제조부문 등 다방면에서 날로 증가되어 가고 있으나 우리나라의 자연환경에 존재하는 이들 효소 생성균인 미생물자원에 관한 생물학적 기초 조사는 아직도 거의 미개척 상태에 놓여 있다.

본 연구에서는 우리나라 중부 이남 지역에서 수집한 표본으로부터 700여 균주의 *Rhizopus*를 분리, 동정하고 그들의 효소 활성 즉 glucoamylase, dextrinogenic amylase, cellulase, acid protease 및 neutral protease 등의 활성을 측정 비교하여 우량균주를 선정하고 효소의 활성과 균주의 계통 및 생태적 요인과의 상관관계를 해석함과 동시에 amylase 생성능에 미치는 nutrient의 영향등을 조사하여 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험재료

우리나라 중부이남에서 수집한 여러가지 표본중에서 분리한 *Rhizopus*속으로 동정된 735균주를 본 실험의 실험재료로 사용하였으며 amylase 생성능에 미치는 nutrient의 영향에는 *R. niveus* IAM6035 균주를 사용하였다. 분리한 균주의 표본채취 지점을 Fig. 1에 표시하였다.

2. 균주의 분리 및 보존

표본 10g을 Pfeffer 용액에 넣고 30°C에서 3일간 배양한 후 균주를 분리하였다. 분리된 균주는 potato 배지에서 30°C에 7일간 순수배양한 후 5°C에서 보존하였다.

3. 종의 동정

본 실험의 종 동정은 Inui *et al.* (1965)의 방법에 Takeda (1949)의 방법을 가미한 개량법으로 행하였다. 즉 순수 분리한 균주를

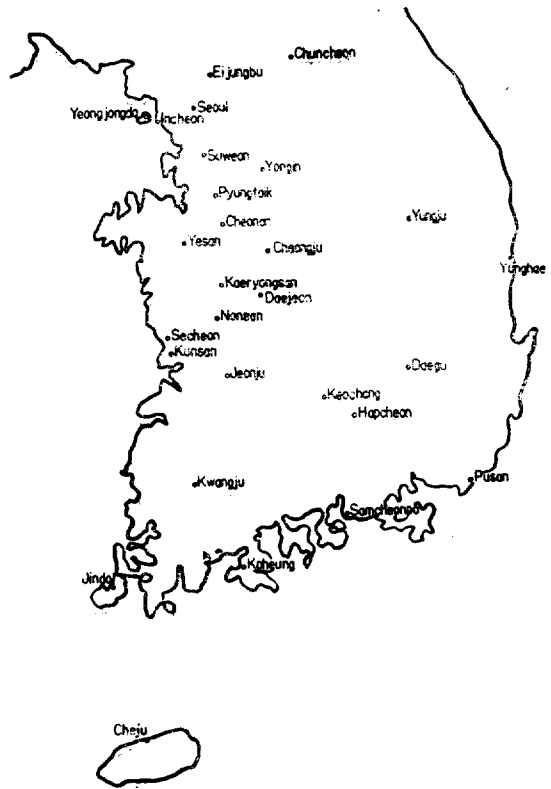


Fig. 1 Collection areas of the samples.

Pfeffer-thiamine 고체배지에 접종하여 30°C에서 14일간 배양한 후 균사층과 포자낭층의 형성능, 37°C에서 Pfeffer 액체배지로서 배양하였을 때 균주의 성장여부 그리고 질소원으로 sodium glutamate 4.2%를 첨가한 Pfeffer 액체배지에서 배양한 균주의 mycelial mat의 이면의 색깔 등 배양적 특성과 유기산생성, 후막포자형성 등 생리적, 형태적 특성을 조사하여 동정하였다.

4. 효소액의 조제

용량 250ml의 삼각 flask에 soluble starch 5gr, glucose 5gr, KH_2PO_4 0.1gr, peptone 0.5gr, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01gr, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001gr, 증류수 100ml를 넣은 배양액에 CaCO_3 1.5gr을 첨가한 후 일정량의 *Rhizopus*를 접종하여 30°C에서 3일간 진탕 배양하고 배양액을 10,000 r.p.m.에서 20분간 원심분리한 상등액을 효소액으로 사용하였다.

amylase 생성능에 미치는 nutrient의 영

향에 대한 실험에서는 Petri dish에 20gr의 wheat bran을 넣고 각종 carbon source 또는 growth substance를 5%씩을 첨가하여 *R.niveus* IAM 6035를 접종하여 30°C에서 3일간 정치배양한 후 증류수 100ml를 가하고 실온에서 3시간동안 방치한 후 현탁액을 원심분리 하고 상등액을 다시 여과시킨 다음 여과액을 효소원액으로 사용하였다.

5. 효소활성의 측정

Dextrinogenic amylase; dextrinogenic amylase의 활성측정은 blue-value법에 의해 0.2% soluble starch를 기질용액으로 하여 측정하였다. 기질용액 2ml와 0.4M-acetate 완충액 1ml를 가하여 30°C의 항온수조에서 5분간 예열한후 각기 측정하고자 하는 효소액 1ml를 가하여 40°C에서 30분간 반응시킨후 0.5N초산을 10ml 가하여 반응을 정지시키고 그 1ml를 취하여 1/3,000N-I₂ 용액 1ml를 넣고 700m μ 에서의 흡광도를 측정하여 전보(Lee & Yoon, 1973)에서와 같이 RDP(relative dextrinizing power)로 표시하였다.

Glucoamylase; glucoamylase의 활성은 Somogi-Nelson 법(Nelson, 1944)에 의해 측정하였다. 기질용액으로는 0.2% soluble starch를 사용하여 이용액 1ml에 0.4M acetate 완충액 0.5ml, 효소액 0.5ml(원액을 100배로 희석)을 가하고 37°C에서 10분간 반응시킨 다음 low-alkalinity copper 시약 2ml를 가하고 30분간 끓인후 냉각시킨다. 완전히 냉각 후 Nelson's arsenomolybdate 시약 1ml를 가하여 20분간 실온에서 방치한 후 20ml의 증류수를 가한 다음에 500

m μ 의 파장에서 흡광도를 측정하여 생성된 환원당의 량을 glucose (mg/ml)로 표시하였다.

Protease; 산성 protease와 중성 protease의 활성은 1.5% milk-casein 용액을 기질로 하여 Folin-Ciocalteu reagent법(Folin, 1955)으로 측정하였다. 각기 1.5% milk-casein 용액 1ml를 시험관에 넣고, 37°C에서 5분간 예열한 후 여기에 효소액 1ml를 가하여 혼합한 후 37°C에서 60분간 반응시킨 다음 0.4M-TCA 2ml를 가하여 37°C에서 25분간 반응시켜 단백질을 제거한 후 여과시킨다. 여과액 1ml를 0.4M-Na₂CO₃ 용액 5ml와 Folin 시약(5배 희석액) 1ml를 가하여 37°C에서 20분간 작용시킨후 660m μ 의 파장에서 흡광도(OD)를 측정하였다. 효소의 역가는 시험치와 공시험치(OD')의 흡광도의 차에다 100을 곱한것을 단위로 하였다.

$$\text{단백질 분해력} = (\text{OD} - \text{OD}') \times 100$$

Cellulase; cellulase의 활성은 기질용액으로서 0.2% carboxymethyl cellulose (CMC) 용액을 사용하였으며 역가 측정은 Somgi-Nelson법에 의해 포도당 함량으로 표시하였다.

결과 및 고찰

1. 우량균주의 선정

일차선정 : 우량균주를 선정하기 위하여 먼저 분리한 *Rhizopus* 735균주의 dextrinogenic amylase, glucoamylase, cellulase, acid protease 및 neutral protease 활성을 각각 측정 비교하여 일차적으로 각 효소마다 10균주씩 50균주를 선정하였다. 그 결과를

Table 1. Preliminary selection of *Rhizopus* strains for predominant enzyme activities.

Enzyme	Strain No.									
Dextrinogenic amylase	165	168	182	186	203	247	304	352	474	682
Glucoamylase	73	89	101	329	639	655	656	672	677	696
Cellulase	130	218	258	435	655	660	667	668	673	825
Acid protease	91	107	108	119	123	148	163	174	181	804
Neutral protease	254	264	276	286	294	355	530	538	587	728

Table 2. Selected strains of *Rhizopus* and their enzyme activities.

Strain No.	Species	Collection area	Substrate	Enzyme activities				
				Dextrinogenic amylase (RDP)	Glucosyl amylase (mg/ml)	Cellulase (mg/ml)	Acid protease (u)	Neutral protease (u)
587	Unidentified strain	Jeonju	Fruit	17.3	22.7	66.50	100	355
182	<i>R.delemar</i>	Seoul	Korean cake	17.2	23.2	56.00	50	210
165	<i>R.oryzae</i>	Pyungtaik	Kokja	18.2	8.5	32.60	64	64
329	Unidentified strain	Seoul	Korean cake	0.37	38.1	34.22	40	224
108	<i>R.oryzae</i>	Cheongju	"	8.10	12.7	4.56	183	156
174	<i>R.tritici</i>	Pyungtaik	Bread	1.51	11.8	8.00	180	171
286	<i>R.delemar</i>	Suweon	Straw	0.91	16.5	29.82	90	305
728	Unidentified strain	Kwanjgu	Cereal	0.62	12.9	53.66	80	335
258	<i>R.nigricans</i>	Cheongju	"	0.00	2.2	75.82	65	155
673	<i>R.nigricans</i>	Kwangju	Fruit	0.00	1.2	81.66	70	31

Table 1에 표시하였다.

최종선정 : 일차적으로 선정한 50균주의 *Rhizopus*를 대상으로 2차적인 선별 실험을 한 결과 최종적으로 선정된 10균주와 그들의 효소활성을 Table 2에 표시하였다. 이들 중 균주번호 587 및 182는 시험한 2종류 이상의 효소활성이 우수한 균주로서 선정되었는데 특히 균주번호 587은 neutral protease 및 dextrinogenic amylase의 활성이 다같이 우수하였다. 우수한 cellulase 활성을 가

지는 균주로는 균주번호 673 및 258이 선정되었고, glucoamylase와 dextrinogenic amylase를 위해서는 균주번호 329와 165가 각각 선정되었다. neutral protease 활성은 균주번호 286 및 728이 우수하였고, acid protease는 균주번호 108 및 174가 우수하였다.

2. 균주의 동정

분리한 735균주의 *Rhizopus*로부터 *R. nigricans*, *R.oryzae*, *R.formosaensis*, *R.*

Table 3. Characteristics of identified species.

Items Species	Turf composition	Chlamydo-spore	Color of the reverse side of mycelial mat on Na-glutamate medium	Acid production	Growth at 37°C
<i>R. nigricans</i>	++++	-	dark brownish gray	-	-
<i>R. formosaensis</i>	++++	-	dark yellowish brown	fumaric acid	+
<i>R. javanicus</i>	++++	+	grayish brown or pale yellowish brown	"	+
<i>R. tritici</i>	++++	+	" "	lactic acid	+
<i>R. acidus</i>	++++	+	" "	fumaric acid	+
<i>R. oryzae</i>	+++	+	" "	lactic acid	+
<i>R. delemar</i>	+++	+	" "	fumaric acid	+
<i>R. jeponicus</i>	++	+	" "	fumaric acid lactic acid	+

Abbreviations, ++++ ; only sporangial layer, +++ ; more sporangial layer than mycelial layer, ++ ; more mycelial layer than sporangial layer

Table 4. Mean enzyme activities of *Rhizopus* strains surveyed from taxonomical viewpoint.

Species	No. of strains	Enzyme activities				
		Dextrinogenic amylase (RDP)	Glucosyl amylase (mg/ml)	Cellulase (mg/ml)	Acid protease (u)	Neutral protease (u)
<i>R. nigricans</i>	518	2.05	5.88	17.55	65.88	121.93
<i>R. oryzae</i>	71	3.03	6.51	9.35	95.75	101.65
<i>R. formosensis</i>	3	3.21	6.50	8.85	67.67	60.33
<i>R. tritici</i>	18	4.34	7.99	12.34	121.59	124.00
<i>R. acidus</i>	15	6.67	8.98	10.74	98.27	86.40
<i>R. javanicus</i>	3	4.03	10.67	4.97	105.67	91.00
<i>R. japonicus</i>	4	5.80	8.02	13.34	102.25	95.00
<i>R. delemar</i>	51	2.16	6.48	9.60	79.82	96.18
Unidentified strain	52	5.51	13.29	35.28	78.52	156.16
Mean	735	2.58	6.65	17.03	73.02	119.41

acidus, *R. javanicus*, *R. japonicus*, *R. delemar* 등 8종을 동정했다. 동정된 종의 특성을 Table 3에 표시하였다.

3. *Rhizopus*의 계통과 효소활성

*Rhizopus*의 종에 따른 효소활성의 측정치를 Table 4에 표시하였다. Table 4에서 보는 바와 같이 균주의 효소활성은 종에 따라 큰 차이를 나타내고 있으나 같은 종에 있어서도 균주에 따라 차이가 심하였다. dextrinogenic amylase 활성은 일반적으로 *R. acidus* 및 *R. japonicus* 등이 비교적 높았고 glucoamylase 활성도 *R. javanicus*, *R.*

acidus, *R. japonicus* 등이 비교적 높았으나 *R. nigricans*의 amylase 활성은 양측이 모두 현저하게 낮았는데 이러한 결과는 전보(Lee & Yoon, 1974)에서의 결과와 대체로 일치한다.

그러나 cellulase 활성은 amylase 활성이 낮은 *R. nigricans*에서 가장 높은 값을 나타내었고 protease 활성은 acid protease나 neutral protease가 다 같이 *R. tritici*에서 가장 높은 값을 나타내었다.

4. 생태적요인과 균주의 효소활성

분리한 기질에 따른 *Rhizopus* 균주의 효

Table 5. Enzyme activities of Korean wild strains of *Rhizopus* based on the original substrates from which the strains were isolated.

Substrate	No. of strains	Enzyme activities				
		Dextrinogenic amylase (RDP)	Glucosyl amylase (mg/ml)	Cellulase (mg/ml)	Acid protease (u)	Neutral protease (u)
Meju	30	2.18	6.22	12.97	80.67	93.45
Kokja	33	2.76	6.74	11.36	75.79	78.14
Korean cake & Bread	204	2.57	6.69	20.58	70.86	110.35
Cereals & Germ barley	112	2.81	7.49	18.48	77.80	126.34
Fruit	67	2.70	6.63	17.80	66.15	133.07
Wood	49	2.64	6.37	14.72	71.51	132.78
Straw	72	2.27	6.69	17.68	76.02	127.41
Others	168	2.72	6.97	18.17	70.20	130.65
Mean	735	2.58	6.65	17.03	73.02	119.41

Table 6. Enzyme activities of Korean wild strains of *Rhizopus* from different regions.

Region	No. of strains	Enzyme activities				
		Dextrinogenic amylase (RDP)	Gluco-amylase (mg/ml)	Cellulase (mg/ml)	Acid protease (u)	Neutral protease (u)
Middle Inland	303	2.85	7.23	16.19	74.24	121.16
Southern Inland	240	2.74	7.32	18.81	69.74	124.47
Middle Coast	165	2.15	5.81	15.91	72.90	120.88
Southern Coast	27	1.92	5.80	15.89	75.55	93.30
Mean	735	2.53	6.65	17.03	73.02	119.41

소활성을 Table 5에 표시하고 지리적 분포에 따른 균주의 효소활성을 Table 6에 표시하였다. Table 5에서 보는 바와같이 분리한 기질에 따른 야생균주의 효소활성은 큰 차이를 나타내지 아니하였다. 곡류나 밀기울에서 분리한 균주의 amylase 활성과 메주에서 분리한 *Rhizopus*의 acid protease 활성이 다른 기질에서 분리한 균주의 그것보다 약간 높은 값을 나타내었으나 현저하지는 아니하였고 cellulase 활성은 빵이나 떡에서 분리한 균주가 약간 높은 값을 나타내었다.

지역적 분포에 따른 *Rhizopus* 균주의 효소활성은 Table 6에서 보는 바와같이 현저하지는 않으나 내륙지방에서 분리한 균주의 amylase 활성이나 cellulase 활성이 해안지방에서 분리한 균주의 그것보다 약간 높은 값을 나타내었다. 그러나 이러한 경향은 protease의 경우에는 전혀 찾아볼 수가 없었다.

5. Amylase 생성능에 미치는 탄소원의 영향

*R.niveus*의 glucoamylase 및 dextrinogenic amylase의 생성능에 미치는 여러가지 탄소원의 영향을 Fig.2 및 Fig.3에 각각 표시하였다. 밀기울에 여러가지 탄소원의 하나씩을 각각 첨가하였을 때 lactose가 glucoamylase의 생성을 가장 크게 촉진시켰다는 Pfeffer's 배지에서 탄소원을 sucrose에 대체하여 lactose를 사용하였을 때 균체의 생장이 현저히 감소하는(Lee & Lee,

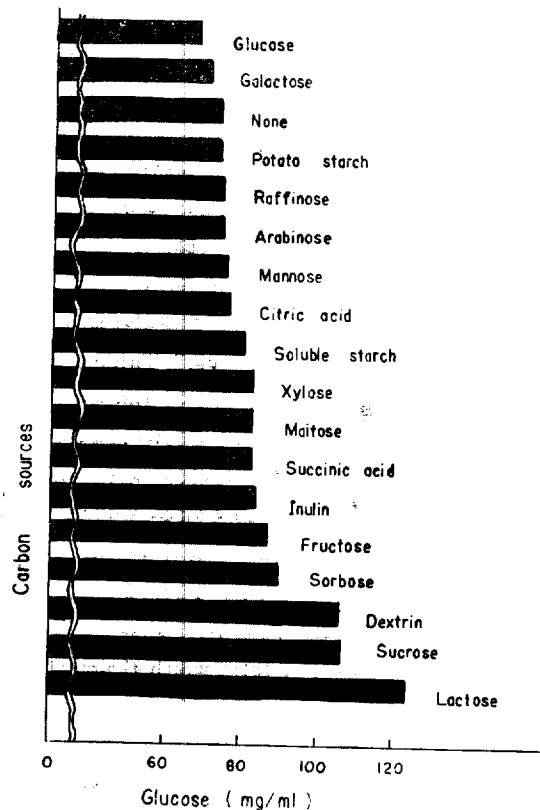


Fig. 2 Effect of various carbon sources on glucoamylase production

1973) 접으로 미루어 보아 lactose가 이 효소의 inducer 역할을 하는것이 아닌가 하는 생각을 가지게 하나 확실한 것은 추시를 통하여 더욱 추궁하여야만 하겠다. 또한 dextrinogenic amylase 생성능도 dextrin의 첨가로 현저히 증가하였는데 이는 Saito & Yamamoto(1975)가 *Bacillus licheniformis*

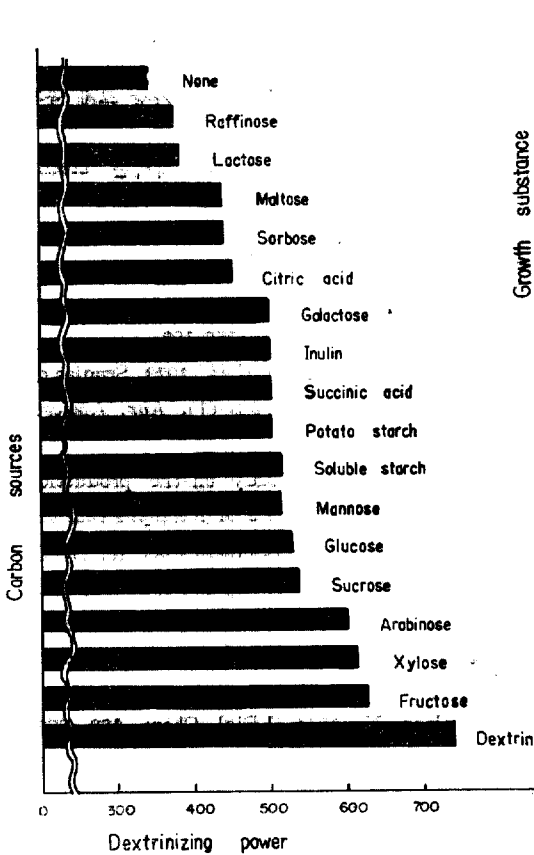


Fig. 3 Effect of various carbon sources on dextrinogenic amylase production

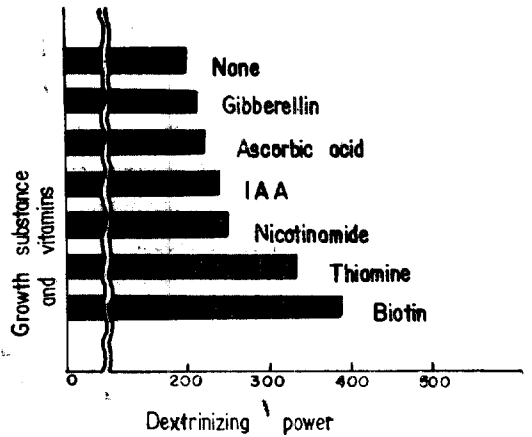
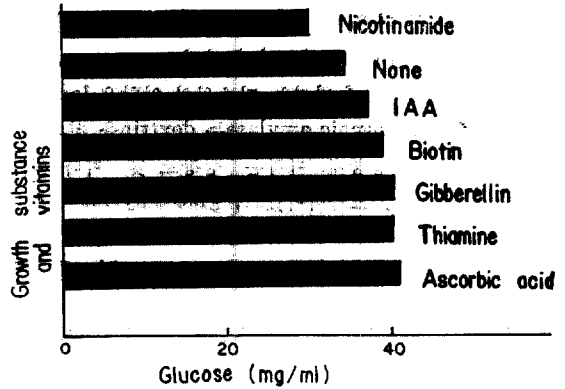


Fig. 4 Effect of growth substance and vitamins on amylase production

에서 관찰한 결과와 일치된다.

6. Amylase 생성능에 미치는 성장소 및 비타민의 영향

*R.niveus*의 glucoamylase 및 dextrinogenic amylase 생성능에 미치는 성장소 및 비타민의 영향을 Fig.4에 표시하였다. glucoamylase의 생성능에 미치는 nicotinamide

의 효과를 제외하면 공시한 성장소나 비타민이 모두 다 효과적으로 작용하였으나 그 중에서도 dextrinogenic amylase 생성에는 biotin, thiamine이 가장 효과적이었고 glucoamylase 생성은 ascorbate, thiamine, giberellin 등이 모두 다 현저히 촉진시켰다.

적 요

한국산 *Rhizopus* 735균주를 분리하여 이를 동정하고 그들의 효소활성을 측정 비교하여 이를 분류학적, 생태학적, 생리학적 측면에서 검토하고 우량균주를 선정함과 동시에 amylase 생성능에 미치는 탄소원 및 성장소의 영향등을 측정 비교하였다.

균주번호 537 및 182는 두가지 이상의 효소활성이 우수한 균주로 선정되었고, 균주번호 673, 108, 329, 165 및 728 등은 각 cellulase, acid protease, glucoamylase, dextrinogenic amylase 및 neutral protease가 우수한 균주로 선정되었다.

종에 따른 효소활성은 *R.acidus*, *R.japonicus*등이 비교적 높은 dextrinogenic amylase와 glucoamylase 활성을 보여주었고 *R.nigricans*는 amylase 활성은 낮은 반면에 cellulase활성은 가장 높았다 *R.tritici*는 acid protease와 neutral protease 활성이 모두 높았다.

기질에 따른 활성은 큰 차이가 없었으며 지역적 분포에 따른 활성은 protease를 제외하고는 내륙지방의 균주가 해안지방의 것보다 높았다.

Amylase 생성능에 미치는 탄소원의 영향은 lactose를 첨가시 glucoamylase의 생성이 가장 크게 촉진되었고, dextrinogenic amylase는 dextrin을 첨가시 현저한 증가를 보여 주었다.

Amylase 생성능에 미치는 생장소 및 비타민의 영향은 dextrinogenic amylase에서는 biotin, thiamine이 가장 효과적이었고, glucoamylase 생성은 ascorbate, thiamine등이었다.

인 용 문 헌

- Cleveland, F.C., W.J. Katzbeck, and R.W. Kerr., 1951. The action of amyloglucosidase on amylose and amylose and amylopectin. *J. Amer. Chem. Soc.*, **73**, 3916-3921.
- Folin, O., and Smith, E.L., 1955. *J. Biol. Chem.*, **73**, 627.
- Fukumoto, J., 1943. Studies on bacterial amylase. I. Isolation of bacteria excreting potent amylase and their distribution. *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, **19**, 487-503.
- Fukumoto, J., 1943. Studies on bacterial amylase. III. Conditions of amylase production. (1). *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, **19**, 689-692.
- Fukumoto, J., 1944. Studies on bacterial amylase. VI. Liquefaction and saccharification. *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, **20**, 23-26.
- Fukumoto, J., T. Yamamoto, and D. Tsuru., 1957. Formation of bacterial amylase and proteinase. *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, **31**, 506.
- Imada, I, Comada, K. and Wada, S., 1962. Studies on cellulase of *Rhizopus*. *J. Ferment. Technol., Japan*, **40**, 140.
- Inui, T., Y. Takeda, and Iizuka, H., 1964. Taxonomical studies on Genus *Rhizopus*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **II**, Suppl. 1-121.
- Lee Y.N. and Lee, P.W., 1973. Studies on the amylase of *Rhizopus*. (III). Nutritional and cultural characteristics of *R. niveus* *Kor. J. Microbiol.*, **11**, 121-128.
- Lee, Y.N. and Yoon, K.H., 1973. Studies on the amylase of *Rhizopus*(II). *Kor. J. Microbiol.*, **11**, 89-100.
- Lee, Y.N. and Yoon, K.H., 1974. Amylase activity of the *Rhizopus* distributed in South Korea. Proceedings of the First International Congress of IAMS., **5**, 185-189.
- Lee, Y.N. and Yoon, K.H., 1973. Studies on the amylase of *Rhizopus* (1). *Kor. J. Microbiol.*, **11**, 31-50.
- Lin, C.F., 1972. Study on the production of hydrolytic enzymes of *Rhizopus thailandensis*. *J. Chinese Agr. Chem. Soc.*, **10**, 77-83.
- Lowry, O.H. Rosebrough, N.J. Farr, A.L. Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- Nelson, N., 1944. *J. Biol. Chem.*, **153**, 375. in "Methods in Carbohydrate Chemistry 1" (Whistler, R.L., et al., 1962).
- Phillips, L.L., and M.L. Caldwell., 1951. A study of the purification of a glucose-forming amylase from *Rhizopus delemar*, Gluc Amylase. *J. Amer. Chem. Soc.*, **73**, 3559-3563.
- Saito, N. and Yamamoto, K., 1975. Regulatory factors affecting L-amylase Production in *Bacillus licheni formis*. *J. Bacteriol.*, **121**, 848-856.
- Takahara, Y. et al., 1964. Studies on cellulase in *Rhizopus*. (I). The medium composition and assay methods for cellulase. *J. Ferment. Technol., Japan*, **42**, 363.
- Takahara, Y. et al., 1964. Studies on cellulase in *Rhizopus*. (II). Distribution of cellulase forming power in *Rhizopus* Genus. *J. Ferment. Technol., Japan*, **42**, 368.
- Wang, and C.W. Hesseltine., 1965. Studies on the extracellular proteolytic enzymes of *Rhizopus oligosporus*. *Canad. J. Microbiol.*, **11**, 723-732.