

송이균사(*Tricholoma matsutake*) 배양액의 세포외 효소 활성

이창윤 · 홍운표¹ · 정명준¹ · 한영환^{2*}

동국대학교 응용생물학과, ¹셀바이오테크, ²동국대학교 생물학과

The Extracellular Enzyme Activities in Culture Broth of *Tricholoma matsutake*

Chang-Yun Lee, Oun-Pyo Hong¹, Myung-Jun Jung¹, and Yeong-Hwan Han^{2*}

Department of Applied Biology, Dongguk University, Seoul 100-715

¹Cell-Biotech, Wolkot, Kimpo 415-870

²Department of Biology, Dongguk University, Kyongju 780-714, Korea

ABSTRACT: The mycelia of *Tricholoma matsutake* DGUM 26001, 26101, 26210 and FRI 91024 were used to determine the extracellular enzyme activity in mycelia. When the filtrate of culture broth after 30-day cultivation at 24°C was used as a crude solution of extracellular enzyme, the average specific activity of α -amylase was 6142.3 unit/mg·protein. The specific activity of xylanase was comparatively high. However, little or no enzyme activities were found for β -glucosidase, ligninase, CMCase, chitinase, protease, and lipase.

KEYWORDS: *Tricholoma matsutake*, Exomycelial enzymes, Broth, Cultivation

송이(*Tricholoma matsutake*)는 독특한 향취물질(1-octene-3-ol, 2-octanol, 1-octene, 4-methyl cinnamic acid 등)과 맛으로 인하여, 한국, 일본, 중국 등의 동아시아 지역에서는 식용버섯 중 가장 선호하는 담자균류 버섯으로 알려져 왔다. 송이는 분류학적으로 *Tricholomataceae*과에 속하며, *Pinus*, *Tsuga*, *Picea* 그리고 *Abies*속의 침엽수에 공생하는 외생균근성이다(Ogawa, 1976a, 1976b, 1977, 1981; Ogawa와 Ohara, 1978).

현재까지 송이에 대한 연구는 주로 생태학적인 연구(Kang 등, 1989; Lee, 1991; Ogawa, 1976, 1977, 1981; Song and Min, 1991)와 인공 자실체 발생에 관한 연구(Ito, 1981; Kawai와 Ogawa, 1976, 1977; Lee 등, 1984; Ogawa와 Hamada, 1975; Ogawa와 Kawai, 1976; Ogawa 등, 1978; Okazawa, 1978; Ryu 등, 1980; Yokoyama와 Yamada, 1987)가 주류를 이루어 왔다. 그 외에 몇몇 유전학적 연구(Hwang와 Kim, 1995; Iwase

등, 1987; Lee와 Sung, 1997), 송이버섯의 저장(Cho 등, 1984), 형태학적 연구(Shimazono, 1979), 향취물질(Ahn와 Lee, 1986; Ohta, 1983; Tsuruta와 Kawai, 1979) 및 균사생리에 관한 연구(Lee 등, 1997)가 있었으나, 송이의 효소에 관한 연구는 carboxyl proteinase 효소에 대한 연구(Terashita와 Kono 1987, 1989)가 보고되었을 뿐이다.

본 연구에서는 액체배양액 중의 송이균사가 갖고 있는 효소활성을 측정하여 송이 균사의 생리학적 특성을 조사하고, 추후 산지별 송이의 동정을 위한 기초자료로 활용하고자 수행하였다.

재료 및 방법

사용 균주

본 연구에 사용한 송이는 경북 경주시(*T. matsutake* DGUM 26001) 및 청도군(*T. matsutake* DGUM 26101), 전북 남원(*T. matsutake* DGUM 26201)으로부터 채집하여 전보의 Lee 등

*Corresponding author

Table 1. The mycelia of *Tricholoma matsutake* used in this study

Strain No.	The site of collection	Institute of isolation
DGUM 26001	Kyongju, Kyongbuk	Microbiolgy Lab. Dongguk Univ.
DGUM 26101	Chongdo, Kyongbuk	Microbiolgy Lab. Dongguk Univ.
DGUM 26201	Namwon, Chonbuk	Microbiolgy Lab. Dongguk Univ.
FRI 91024	Samchok, Kangwon	Forest Research Institute

(1997)의 방법으로 분리, 동정한 송이균사 균주와 임업연구원으로부터 입수한 균주(*T. matsutake* FRI 91024)를 사용하였다(Table 1).

균사의 배양

송이균사의 계대배양을 위하여 TMM 한천배지를 사용하였으며, 그 조성은 다음과 같다: 2.0% glucose, 0.15% yeast extract, 0.15% soytone, 1.5% agar, pH 5.2. 계대배양은 3개월마다 수행하였다.

사용한 배지는 일반적인 효소생성의 pattern을 보기 위하여 최대 균사생장을 보인 SYSP액체배지(Lee 등(1997), 조성: 2.0% starch, 0.15% yeast extract, 0.15% soytone, 0.001% pyridoxine-HCl, pH 5.2)를 사용하였으며, 각 효소의 유도에 관한 기질의 첨가실험은 추후 수행예정이다. 250 ml의 삼각플라스크에 100 ml의 SYSP 액체배지를 제조하여 120°C에서 20분간 가압멸균하여 냉각 후, 최종농도가 0.001%가 되도록 준비된 pyridoxine 비타민 용액을 막여과(membrane: pore size=0.22 µm)하여 첨가하였다.

송이균사의 접종은 TMM 한천배지에서 30일 동안 배양한 송이 균사를 cork borer(diameter, 8 mm)로 떼어낸 후, 100 ml에의 액체배지에 5개씩 접종하였다. 24°C에서 30일간 진탕배양(120 rpm)한 후, 효소 활성을 측정하였다.

조효소액 및 단백질 농도의 측정

30일 동안 배양한 배양액을 여과지(Toyo, 90

mm)로 여과하여 그 여액을 조효소액으로 사용하였다. 단백질 농도는 Bradford의 방법(1976)을 사용하였으며, bovine serum albumin을 표준품으로 사용하였다.

효소활성의 측정

α-Amylase: Danielson(1947)의 방법으로 수행하였으며, 환원당의 측정은 DNS법(Miller, 1959)을 사용하였다. 1 unit는 1분 동안 1 µmol의 환원당(glucose)이 생성되는 양으로 정의하였다.

β-Glucosidase: Tokao 등(1985)의 방법을 변형(24°C에서 반응)하여 수행하였으며, 환원당의 측정은 DNS법(Miller, 1959)을 사용하였다. 1 unit는 1분 동안 1 µmol의 환원당(glucose)이 생성되는 양으로 정의하였다.

Xylanase: Kim 등(1995)의 방법을 변형(24°C에서 반응)하여 수행하였으며, 환원당의 측정은 DNS법(Miller, 1959)을 사용하였다. 1 unit는 1분 동안 1 µmol의 환원당(xylose)이 생성되는 양으로 정의하였다.

Ligninase: Kang 등(1994)의 방법을 사용하였으며, 1 unit는 310 nm에서의 molecular extinction coefficient 값($9.3 \times \text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$)을 사용하여 결정하였다.

CMCase: 24°C 반응시킨 것을 제외하고는 Kanda 등(1976)의 방법을 사용하였다. 환원당의 측정은 DNS법(Miller, 1959)을 사용하였으며, 1 unit는 1분 동안 1 µmol의 환원당(glucose) 생성되는 양으로 정의하였다.

Chitinase: Colloidal chitin의 제조는 Hsu와 Lockwood(1975)의 방법을 사용하였으며, 효소활성의 측정은 Jeong and Lee(1995)의 방법을 변형(24°C에서 1분간 반응)하여 수행하였다. 환원당의 측정은 DNS법(Miller, 1959)을 사용하였고, 1 unit는 1분 동안 1 µmol의 환원당(glucose)이 생성되는 양으로 정의하였다.

Protease: Brown과 Schmitz(1980)의 방법을 사용하였으며, 1 unit는 420 nm에서의 흡광도 값이 0.01 증가하는 것으로 정의하였다 (Increase of $\text{Abs}_{420} \times 3.33$).

Lipase: Yang 등(1997)의 방법을 변형하여 수행

하였으며, 1 unit는 1분 동안 1 μmol 의 *p*-nitrophenol 생성되는 양으로 정의하였다.

결과 및 고찰

사용한 네 가지 종류의 송이균사 배양여액에서 가장 높은 비효소활성(specific activity)은 α -amylase로 평균 6142.3 unit/mg·protein을 나타내었다(Table 2~5, Fig. 1). 이 결과는 전보(Lee 등, 1997)에서 밝힌 송이균사의 생육에 starch가 가장 우수한 탄소원인 결과와 상관관계가 있음을

보여주고 있다. Xylan은 목재구성 성분 중의 하나인 hemicellulose로 사용한 송이균사의 평균 xylanase 비효소활성이 163.6 unit/mg·protein(Fig. 1)으로, 측정된 여타 효소에 비하여 상대적으로 높은 값을 보여주었다. 이 결과는 외생균근인 송이가 왜 이 두 종류의 효소에 대하여 높은 효소활성을 나타내는지 추후 계속적인 연구가 요구된다.

부생균으로 알려진 *Ganoderma lucidum*(Do와 Kim, 1986), *Pleurotus ostreatus*(Hiroi와 Eriksson, 1970), *P. sajor-caju*(Madan와 Bisaria, 1983)와 *Irpex lacteus*(Kanda 등, 1976)에서 높은

Table 2. The extracellular enzyme activities in mycelia of *Tricholoma matsutake* DGUM 26001

Enzyme	Activity ($\mu\text{mol}/\text{ml}/\text{min}$)	Conc. of protein* (ug protein/ml)	Specific activity (unit/mg·protein)
α -Amylase	0.35	0.24	1458.3
β -Glucosidase	0.02	6.05	3.3
Xylanase	0.06	1.21	49.6
Ligninase	0.00	1.21	0.0
CMCase	0.02	6.05	3.9
Chitinase	0.03	4.00	7.5
Protease	0.01	1.21	8.3
Lipase	0.00	4.84	0.0

*The protein concentration was determined with a different set of each experiment.

Table 3. The extracellular enzyme activities in mycelia of *Tricholoma matsutake* DGUM 26101

Enzyme	Activity ($\mu\text{mol}/\text{ml}/\text{min}$)	Conc. of protein* (ug protein/ml)	Specific activity (unit/mg·protein)
α -Amylase	1.45	0.15	9666.7
β -Glucosidase	0.01	3.85	2.5
Xylanase	0.20	0.70	285.7
Ligninase	0.00	0.70	0.0
CMCase	0.04	3.85	10.4
Chitinase	0.05	2.60	19.2
Protease	0.01	7.00	1.4
Lipase	0.00	2.80	0.0

*The protein concentration was determined with a different set of each experiment.

Table 4. The extracellular enzyme activities in mycelia of *Tricholoma matsutake* DGUM 26201

Enzyme	Activity ($\mu\text{mol}/\text{ml}/\text{min}$)	Conc. of protein* (ug protein/ml)	Specific activity (unit/mg·protein)
α -Amylase	1.49	0.18	8277.8
β -Glucosidase	0.01	4.55	2.2
Xylanase	0.19	0.91	208.8
Ligninase	0.00	0.91	0.0
CMCase	0.05	4.55	11.0
Chitinase	0.02	3.20	6.3
Protease	0.02	0.91	22.0
Lipase	0.00	3.64	0.0

*The protein concentration was determined with a different set of each experiment.

Table 5. The extracellular enzyme activities in mycelia of *Tricholoma matsutake* FRI 91024

Enzyme	Activity ($\mu\text{mol}/\text{ml}/\text{min}$)	Conc. of protein* (ug protein/ml)	Specific activity (unit/mg·protein)
α -Amylase	1.55	0.30	5166.7
β -Glucosidase	0.02	7.25	2.8
Xylanase	0.16	1.45	110.3
Ligninase	0.00	1.45	0.0
CMCase	0.05	7.25	6.9
Chitinase	0.01	5.00	2.0
Protease	0.01	1.45	6.9
Lipase	0.00	5.80	0.0

*The protein concentration was determined with a different set of each experiment.

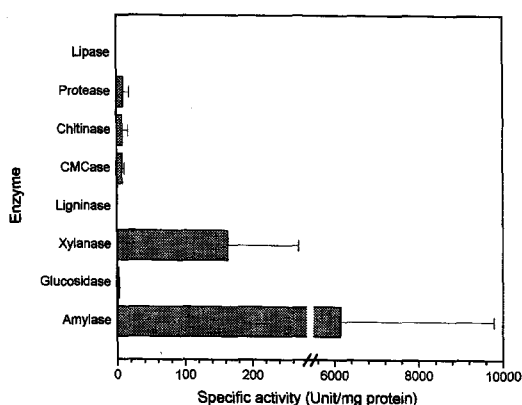


Fig. 1. The average specific activities of extracellular enzymes in culture broth of *Tricholoma matsutake*.

활성을 나타내는 CMCCase 및 β -glucosidase의 비효소활성이 송이균사에서는 각각 8.0 및 2.7 unit/mg·protein(Table 2~5, Fig. 1)으로 낮은 효소활성을 보여주었다. Lignin은 목재성분의 20~30%를 차지하는 phenylpropanoid 다당체로 lignin을 분해하는 미생물로는 일반적으로 *Phanerochaete chrysosporium*(Ming와 Kirk, 1984; Rajagopalan와 Irvine, 1990; Byeong 등, 1996; Kim 등, 1996), *Ceriporiopsis subvermispota*(Kang 등, 1994), *Dichomitus squalens*(Frederic과 Gold, 1991) 등이 보고되었으나, 송이균사의 ligninase의 활성은 거의 없는 것으로 나타났다. 이 효소들의 낮은 효소활성은 송이가 외생균근의 활물기생체로서 성장하는 특성을 간접적으로 보여주는 결과로 생각할 수 있다.

Protease의 비효소활성은 9.7 unit/mg·protein의 낮은 활성을 나타내었으며, 송이균에 대한 Terashita와 Kono(1987; 1989)의 carboxyl proteinase에 대한 보고와 유사한 효소활성을 보여주었다. 활물기생 버섯으로 알려진 *Sarcodon aspratus*(Park, 1986; Uhm 등, 1991)의 결과와 비교시 낮은 활성을 나타내었다. Chitinase 및 ligninase 효소활성은 매우 낮은 결과를 보여주었다(Table 2~5, Fig. 1.).

본 연구의 결과 생체고분자화합물의 분해에 관련된 세포의 분비 효소 중 α -amylase와 xylanase 효소활성이 매우 높았으며, 실험한 다른 효소의 활성

은 매우 적음을 보여주었다. 이 결과는 외생균근인 송이의 활물기생적 특성을 어느 정도 추론케하나, 구체적으로 어떠한 연관관계가 있는지에 대해서는 추후 계속되어야 할 연구과제라 판단된다.

적 요

송이균사(*Tricholoma matsutake* DGUM 26001, DGUM 26101, DGUM 26210, FRI 91024)를 사용하여 균사의 효소활성을 측정하였다. 24°C에서 30일간 배양후 그 여액을 조효소 용액으로 사용하였을 때, α -amylase 효소의 평균 비활성은 6142.3 unit/mg·protein이었다. 배양여액 중의 xylanase의 세포의 효소활성은 상대적으로 높았으나, β -glucosidase, ligninase, CMCCase, chitinase, protease 및 lipase의 효소활성은 낮거나 거의 없었다.

감사의 글

본 연구는 1997년도 산업자원부의 공업기반기술 과제 연구비로 수행된 것으로, 산업자원부의 연구비 지원에 감사한다.

참고문헌

- Ahn, J. S. and Lee, K. H. 1986. Studies on the volatile aroma components of edible mushroom (*Tricholoma matsutake*) of Korea. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* 15(3): 253-257.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brown, V. and Schmitz, G. 1980. Excretion of protease of *Serratia marcescens*. *Arch. Microbiol.* 124: 55-61.
- Byeong, I. S., Kim, Y. H. and Yoo, Y. H. 1996. Shear effects on production of lignin peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 1: 26-31.
- Cho, H. O., Byun, M. W. and Kwon, J. H. 1984. Storage of pine agaric by irradiation combined with natural low temperature. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 16(2): 182-184.

- Danielsson, C. E. 1947. *Nature* **160**: 899.
- Do, J. H. and Kim, S. D. 1986. Enzymatic properties of a cellulase from *Ganoderma lucidum*. *Kor. J. Mycol.* **14**: 79-84.
- Frederic, H. P. and Gold, M. H. 1991. Manganese regulation of manganese peroxidase expression and lignin degradation by the white rot fungus *Dichomitus squalens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**(8): 2240-2245.
- Hiroi, T. and Eriksson, K. E. 1970. Microbiological degradation of lignin. Part 1. Influence of cellulose on the degradation of lignins by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Svensk Papperstidning nr. 5*: 157-161.
- Hsu, S. C. and Lockwood, L. 1975. Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of *Actinomyces* in water soil. *Appl. Microbiol.* **29**: 422-426.
- Hwang, S. K. and Kim, J. G. 1995. Nucleotide sequence analysis of the 5S ribosomal RNA gene of the mushroom *Tricholoma matsutake*. *J. Microbiol.* **33**(2): 136-141.
- Ito, T. 1981. The present status of matsutake production technique in Japan. *Kor. J. Mycol.* **9**(4): 219-222.
- Iwase, K., Matsui, S., Taniguchi, T. and Obayashi, A. 1987. Behavior of cell nuclei during basidiospore formation in *Tricholoma matsutake*. *Trans. Mycol. Soc., Japan* **28**: 63-67.
- Jeong E. U. and Lee, Y. H. 1995. Isolation of microorganism producing chitinase for chitooligosaccharides production, purification of chitinase, and its enzymatic characteristics. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**(2): 187-196.
- Kanda, T., Wakabayashi, K. and Nisizawa, K. 1976. Purification and properties of an endocellulase of avicelase type from *Irpex lacteus* (*Polyporus tuliferus*). *J. Ferment. Technol.* **60**: 381-383.
- Kang A. S., Cha, D. Y., Kim, K. S., Hong, I. P., Suki, C. Croan and Yu, S. H. 1994. Improved production of ligninase and laccase by *Phanerochaete chrysosporium* and *Ceriporiopsis subvermispora*. *Kor. J. Mycol.* **22**(3): 254-259.
- Kang, A. S., Cha, D. Y., Kim, Y. S., Park, Y. H. and You, C. H. 1989. Studies on analyzing meteorological elements related with yield of *Tricholoma matsutake* (S. Ito et Imai) Singer. *Kor. J. Mycol.* **17**(2): 51-56.
- Kawai, M. and Ogawa, M. 1976. Studies on the artificial reproduction of *Tricholoma matsutake* (S. Ito et Imai) Sing. IV. Studies on a seed culture and a trial for the cultivation on solid media. *Trans. Mycol. Soc., Japan* **17**: 499-505.
- Kawai, M. and Ogawa, M. 1977. Studies on the artificial reproduction of *Tricholoma matsutake* (S. Ito et Imai) Sing. V. Effects of some chemicals on the growth of mycorrhizal and non-mycorrhizal soil fungi. *Trans. Mycol. Soc., Japan* **18**: 391-398.
- Kim, D. J., Shin, H. J., Min, B. H. and Yoon, K. H. 1995. Isolation of a thermophilic *Bacillus* sp. producing the thermostable cellulase-free xylanase, and properties of the enzyme. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**(3): 304-310.
- Kim, Y. K., Kim, G. E. and Jeong, M. S. 1996. Cultivation of *Phanerochaete chrysosporium* and lignin peroxidase activity. *J. of Microbiol. Biotechnol.* **6**(6): 420-424.
- Lee, C. Y., Hong, O. P., Jung, M. J. and Han, Y. H. 1997. Effect of carbon sources and vitamins on mycelial growth of *Tricholoma matsutake* DGUM 26001. *Kor. J. Mycol.* **25**(3): 226-232.
- Lee, S. S. 1991. Biology of *Tricholoma matsutake* found at *Pinus densiflora* communities in the areas of Kyoung Sang Do. *Kor. J. Mycol.* **19**: 203-213.
- Lee, S. S. and Sung, C. K. 1997. The mycelia isolated from the basidiocarps of *Tricholoma matsutake* in Korea. *Kor. J. Mycol.* **25**(2): 121-129.
- Lee, T. S., Park, C. J., Shim, W. S., Kim, S. H., Ju, Y. W., Oh, S. W. and Jo, J. M. 1984. Studies on the artificial cultivation and propagation of pine mushroom (II)-Increasing yield and promoting quality of pine mushroom by the cap-covering or soil-covering-. *For. Rep. For. Res. Inst. Korea* **31**: 124-132.
- Madan, M. and Bisaria, R. 1983. Cellulolytic enzymes from an edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. *Biotechnol. Lett.* **5**: 601-604.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
- Ming, T. and Kirk, K. 1984. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**: 2280-

- 2284.
- Ogawa, M. 1976a. Microbial ecology of 'Shiro' in *Tricholoma matsutake* (S. Ito et Imai) Sing. and its allied species. II. *Tricholoma matsutake* in *Pinus pumila* var. *yezoalpina* forest. *Trans. Mycol. Soc., Japan* 17: 176-187.
- Ogawa, M. 1976b. Microbial ecology of 'Shiro' in *Tricholoma matsutake* (S. Ito et Imai) Sing. and its allied species. III. *Tricholoma matsutake* in *Picea glehnii* and *Picea glehnii-Abies sachalinensis* forests. *Trans. Mycol. Soc., Japan* 17: 188-198.
- Ogawa, M. 1977. Microbial ecology of 'Shiro' in *Tricholoma matsutake* (S. Ito et Imai) Sing. and its allied species. IV. *Tricholoma matsutake* in *Tsuga diversifolia* forests. *Trans. Mycol. Soc., Japan* 18: 20-33.
- Ogawa, M. 1981. Mycorrhiza in the pine forest—the ecological study of matsutake as a microorganism. *Kor. J. Mycol.* 9(4): 225-227.
- Ogawa, M. and Hamada, M. 1975. Primordia formation of *Tricholoma matsutake* (S. Ito et Imai) Sing. in pure culture. *Trans. Mycol. Soc., Japan* 16: 406-415.
- Ogawa, M. and Kawai, M. 1976. Studies on the artificial reproduction of *Tricholoma matsutake* (S. Ito et Imai) Sing. III. Effects of growth promoting natural products on the vegetative growth of *T. matsutake*. *Trans. Mycol. Soc., Japan* 17: 492-498.
- Ogawa, M. and Ohara, H. 1978. Microbial ecology of 'Shiro' in *Tricholoma matsutake* (S. Ito et Imai) Sing. and its allied species. VIII. *Tricholoma bakamatsutake* Hongo in *Quercus mongolica* var. *grosserrata* forest and *Q. serrata* forests. *Trans. Mycol. Soc., Japan* 19: 391-405.
- Ogawa, M., Takeo, U., Shuji, K. and Kiso, Y. 1978. Cultivation method of the mycorrhizal fungus, *Tricholoma matsutake* (S. Ito et Imai) Sing. (I) Growing method of the pine saplings infected with *T. matsutake* in the field. *Japan For. Soc.* 60: 119-128.
- Ohta, A. 1983. Quantitative analysis of odorous compounds in the fruitbodies of *Tricholoma matsutake*. *Trans. Mycol. Soc., Japan* 24: 185-190.
- Okazawa, K. 1978. Fruit-bodies of *Tricholoma matsutake* appeared on a pot of dwarfed pines. *Trans. Mycol. Soc., Japan* 19: 87-89.
- Park, W. H. 1986. Studies on enzymes of the higher fungi of Korea (I). Identification of protease in *Sarcodon aspratus*. *Kor. J. Mycol.* 14(1): 25-30.
- Rajagopalan, V. and Irvine, R. L. 1990. Effect of agitation on ligninase activity and ligninase production by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(9): 2684-2691.
- Ryoo, C. I., Nam, S. U., Lee, J. Y. and Lee, S. K. 1980. A study on multiplication of *Tricholoma matsutake*. *Kor. J. Mycol.* 8(1): 7-12.
- Shimazono, H. 1979. Comparative studies on morphological characteristics of the colonies of *Tricholoma matsutake*, *T. fulvocastaneum*, and *T. bacamatsutake* on agar media. *Trans. Mycol. Soc., Japan* 20: 176-184.
- Song, H. S. and Min, K. H. 1991. Microfungal flora of *Tricholoma matsutake* producing and nonproducing sites in the forest of *Pinus densiflora*. *Kor. J. Mycol.* 19(2): 109-119.
- Terashita, T. and Kono, M. 1987. Purification and some properties of carboxyl proteinases from *Tricholoma matsutake*. *Trans. Mycol. Soc., Japan* 28: 245-256.
- Terashita, T. and Kono, M. 1989. Carboxyl proteinases from *Tricholoma matsutake* and its related species. *Mem. Fac. Agr. Kinki Univ.* 22: 5-12.
- Tokao, S., Kamagata, Y. and Sasaki. 1985. Cellulase production by *Penicillium purpurogenum*. *J. Agri. Sci. Camb.* 93: 217-222.
- Tsuruta, T. and Kawai, M. 1979. Studies on the artificial reproduction of *Tricholoma matsutake* (S. Ito et Imai) Sing. VII. Antibiotic activities of volatile substances extracted from a "Shiro" of *T. matsutake*. *Trans. Mycol. Soc., Japan* 20: 211-219.
- Uhm, T. B., Ryu, K. S., Kim, M. K., Yoo, J. S., Sohn, H. S. and Lee, T. K. 1991. Characterization of a serine protease from neungee [*Sarcodon aspratus*(Berk.) S. Ito]. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 20(1): 35-39.
- Yang, Y. K., Moon, M. N., Lee, Y. H. and Lim, C. Y. 1997. Development of lipase hyper-producing strain from hybrids between *Aspergillus niger* and *Penicillium chrysogenum* by nuclear transfer. *Kor. J. Microbiol.* 33(1): 31-37.
- Yokoyama, R. and Yamada, T. 1987. *In vitro* cultures of *Tricholoma matsutake* and *Pinus densiflora*. *Trans. Mycol. Soc., Japan* 28: 331-338.