

할미송이버섯으로부터 혈전용해효소의 정제 및 특성 연구

김 준 호*

상지대학교 이공과대학 화학과

Purification and Characterization of Fibrinolytic Enzymes from *Tricholoma saponaceum*

Jun-Ho Kim*

Department of Chemistry, Sangji University, Wonju 220-702, Korea

Two fibrinolytic enzymes were purified from the fruiting bodies of *Tricholoma saponaceum*. The enzymes have a molecular weight of 18(FE-1) and 18.2(FE-2) kDa, respectively, and include Zn^{2+} ion as determined by ICP/MS. The N-terminal amino acid sequence of the two enzymes were exactly the same: A-L-Y-V-G-X-S-P-X-Q-Q-S-L-L-V. The activity of FE-1 was highly inhibited by EDTA and 1,10-phenanthroline, indicating that the enzyme is a metalloprotease. The activity of FE-1 was slightly increased by Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} and Co^{2+} , however, the enzyme activity was totally inhibited by Hg^{2+} . Addition of Zn^{2+} and Co^{2+} reversed the inhibition caused by 1,10-phenanthroline. It has a pH optimum at pH 7.5, suggested that FE-1 was a neutral protease. It shows the maximum fibrinolytic activity at 55°C, is completely inactivated above at 65°C.

KEYWORDS: Fibrin plate assay, fibrinolytic enzyme, *Tricholoma saponaceum*

혈관이 손상되면 출혈이 일어나고 지혈과정이 뒤따른다. 이 과정에서 형성된 혈소판과 섬유소(fibrin)의 응집체인 혈전(thrombus)은 지혈과정이 완결되고 손상된 부위의 조직이 재생되면 plasminogen 활성화제인 urokinase, tPA(tissue-type plasminogen activator), streptokinase에 의해 plasminogen이 활성화된 plasmin에 의해 용해되어 혈관의 혈액은 다시 정상 상태를 유지하게 된다(김, 1998). 그러나 지혈 과정 중 과응고가 일어나거나 또는 혈관 내에 평형을 유지하고 있는 혈액 응고계와 용해계에 균형이 깨지면 형성되었던 혈전은 쉽게 용해되지 않는다. 이 혈전은 혈관을 따라 흐르며 뇌혈전증, 뇌출혈, 심부전증, 심장마비와 같은 혈관계 질환을 유발하는데 현대인의 사망 원인 중 혈관계 질환에 의한 사망이 39%로 알려지고 있어(정, 1991) 이 혈관계 질환의 주원인 중 하나인 혈전을 용해하는 혈전 용해제에 관한 관심이 점점 더 커지고 있다. 지금까지 사용되고 있는 혈전 용해제로는 urokinase, tPA, streptokinase(Reed *et al.*, 1995) 등이 있으나 urokinase를 제외하고는 경구 투여를 할 수 없고(Sumi *et al.*, 1985) tPA의 경우 반감기가 짧은 단점이 있다(Kim, 1998). 이 용해제들은 투여 시 혈전에 대한 선택성이 적어 전신출혈이 발생하며 또한 가격이 비싼 단점이 있다(김, 1986). 기존에 사용되고 있는 혈전 용해제들은 plasminogen 활성화제들로 간접적인 방법으로 혈전을 용해하지만 혈전을 직접 용해하는 새로운 혈전 용해제들이 보고되고 있다.

혈전을 직접용해 하는 효소를 뱀독(Chung and Kim, 1992) 과 지렁이(Mihara *et al.*, 1991, 1993)로부터 분리하였다는 보고가 있으며 근래에는 발효식품인 청국장(Kim *et al.*, 1996), 된장(Kim, 1998), 젓갈(Kim *et al.*, 1997), natto(natto-kinase) (Sumi *et al.*, 1987), shiokara (katsuwo-kinase)(Sumi *et al.*, 1995)에서의 분리도 발표되고 있다.

본 실험실에서는 다양한 종류의 효소를 포함하고 있는 버섯에 혈전의 주성분인 섬유소를 분해하는 효소가 있다는 보고에(Gavrilova and Falina, 1975) 따라 국내에 자생하는 야생버섯으로부터 혈전용해능을 조사하고(Kim *et al.*, 1998) 뽕나무버섯으로부터 혈전용해효소를 분리한 바 있다(Kim and Kim, 1998). 본 연구에서는 조사한 야생버섯 중 활성이 높은 할미송이버섯으로부터 혈전용해 효소를 분리 정제한 후 그 특성을 연구하여 얻은 결과를 발표하고자 한다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 버섯시료는 1998년 10월 3일 치악산에서 채집하여 분류동정 후 시료로 사용하였다. 시약으로 사용한 fibrinogen, plasmin(P 4895, 3 units), plasminogen, thrombin, bovine serum albumin, agarose, glycine, Sephadex G-150와, protease inhibitor는 Sigma 제품을, DEAE-cellulose는 Whatman 제품을, LMW Electrophoresis calibration Kit는 Pharmacia 제품을 사용하였다.

*Corresponding author

혈전용해 효소(fibrinolytic enzyme)의 정제

모든 정제 과정은 4°C에서 수행하였으며 정제 과정마다 혈전용해능과 단백질 농도를 측정하였다. 채집한 버섯을 20 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0)에 넣고 잘게 부수고 원심분리 하여 얻은 상등액을 24시간 동안 투석 한 후 같은 완충용액으로 평형된 DEAE-cellulose column(20×200 mm)에 흘려 보내고 완충용액 200 ml로 씻어 준 후 0~0.5 M NaCl의 농도 기울기로 용출시켰다. 활성부분은 20 mM sodium phosphate 완충액(pH 6.0)에 투석시킨 후 동일한 완충 용액으로 미리 평형 시킨 fast protein liquid chromatography(FPLC)의 Mono S column(5.0×100 mm)에 주입하였다. 완충 용액 3 ml로 씻어 준 후 0~0.1 M NaCl 농도 기울기로 용출시켰다. 두 번째 행한 FPLC의 경우에는 분획당 용출량은 0.33 ml이고 용출 속도는 분당 1 ml로 하였다. 각 분획의 효소활성을 측정된 후 활성이 있는 부분은 모아 실험에 사용하였다.

단백질의 정량

효소의 단백질 정량은 Lowry 등(1951)의 방법에 의하여 측정하였으며 bovine serum albumin을 사용한 표준곡선에 의하여 환산하였다.

혈전용해 활성의 측정(fibrin plate assay)

Haverkate-Trass의 fibrin plate 법(1974)에 따라 2% gelatin 용액에 녹인 0.7%(W/V) fibrinogen용액 10 ml와 0.05 M barbital 완충용액(pH 7.5)에 녹인 thrombin(100 NIH units) 50 μ l을 잘 섞은 후 이를 petri dish에 부어 fibrin막을 만들었다. 효소 용액을 20 μ l씩 fibrin plate 위에 점적한 후 36°C에서 8시간 방치하였다. 효소에 의해 fibrin막이 용해되면 용해면적을 측정하여 상대적인 활성을 측정하였다. 표준대조구로는 plasmin을 사용하고 plasmin(Sigma P4895, 3 units)을 연속적으로 희석하여 얻은 표준곡선에 따라 활성을 계산하였다.

Fibrin plate는 plasminogen이 제거된 fibrinogen과 plasminogen이 포함된 fibrinogen을 이용하여 두 가지 방법으로 준비하였다.

본 실험에서 혈전용해 효소의 활성에 관련된 실험 결과는 3번 측정 후 평균값이다.

분자량 결정

분리한 단백질의 분자량은 전기영동과 gel filtration을 실시하여 결정하였으며 전기영동은 4.5%의 stacking gel과 13%의 separating gel로 이루어진 SDS-PAGE를 사용하였다. 표준 단백질로는 phosphorylase b(94 kDa), bovine serum albumin(67 kDa), ovalbumin(43 kDa), carbonic anhydrase(30 kDa), soybean trypsin inhibitor(20.1 kDa), α -Lactalbumin(14.4 kDa)를 사용하였으며, gel은 coomassie blue R-250과 silver staining kit로 염색하였다. 또한 gel-filtration에 의한 분자량 측정은 Sephadex G-150을 사용하였고 size marker로는 bovine serum albumin(66 kDa), carbonic anhydrase(29 kDa), cytochrom

C(12.4 kDa), aprotinin(6.5 kDa)을 이용하였다.

N-terminal amino acid analysis

분리된 효소의 amino acid sequencing은 기초과학 지원연 구소에 precise protein sequencing system을 사용하여 수행되었다.

금속 이온의 종류

분리한 효소가 갖고 있는 금속의 종류와 양은 Ultra mass 700 inductively coupled plasma mass spectrometer(ICP-MS)을 이용하여 측정하였다.

최적 pH

효소의 활성에 미치는 pH의 영향은 완충용액으로 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 6.0-7.0), 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 7.0-9.5), 0.1 M carbonate-bicarbonate buffer(pH 9.5-10.0)를 사용하였고 기질로 L-lysine pNA를 사용하여 35°C에서 혈전용해 효소와 반응하는 가수분해 활성을 조사하였다. 즉 3 mM의 기질 50 μ l에 해당하는 buffer 925 μ l와 효소 25 μ l을 넣고 섞은 후 405 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다.

최적 온도

온도 변화에 따른 활성도 변화는 35°C에서 60°C까지 incubator의 온도를 변화시키며 효소를 점적한 plate을 넣고 3 시간 후 plate의 용해면적을 측정하여 효소의 활성을 비교하였다.

효소활성에 미치는 금속 2가 이온의 영향

정제된 효소의 활성에 대한 금속 이온의 영향을 알아보기 위하여 CaCl₂, CoCl₂, ZnCl₂, CuSO₄, MgCl₂, FeCl₂, HgCl₂, EDTA, 1,10-phenanthroline과, 2-mercaptoethanol을 각각 2 mM이 되도록, 20 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5)에 첨가한 뒤, 같은 부피의 혈전용해 효소 용액과 섞은 후 fibrin plate에 점적 하고 36°C incubator에서 8시간 후 용해된 면적을 측정하여 활성을 비교하였다. 또한 4 mM의 1,10-phenanthroline의 첨가에 의해 활성이 감소된 효소용액에 1 mM의 CoCl₂와 ZnCl₂를 첨가하여 효소의 활성 변화를 측정하였다.

결과 및 고찰

혈전용해 효소의 정제

할미송이버섯 내의 혈전용해 효소는 Table 1에서와 같이 3단계를 거쳐 분리 정제하였다. 효소 용액을 DEAE-cellulose에 주입 한 결과 활성을 갖는 대부분의 효소는 관에 붙지 않고 흘러 나왔다(Fig. 1). FPLC의 Mono S column을 이용한 두 번째 실험에서 두 종류의 혈전용해 효소가 두 개의 peak(FE-1, FE-2)로 분리되었으며(Fig. 2) 이들의 SDS-PAGE의 결과가 Fig. 3과 같이 단일 띠로 나타남으로 그 순도를 확인할 수 있다. 즉 할미송이 버섯의 추출용액에 존재하는

Table 1. Purification of Fibrinolytic Enzyme from *Tricholoma saponaceum*

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg protein)	Recovery (%)	Purification fold
Crude extracts	1510	1426	0.95	100	1
DEAE cellulose	39.2	359	9.14	25.1	9.67
1st Mono S (FPLC)	7.92	233	29.4	16.3	31.1
2nd Mono S (FPLC)					
FE 1	4.07	133	32.7	9.32	34.6
FE 2	1.43	62	43.4	4.35	45.9

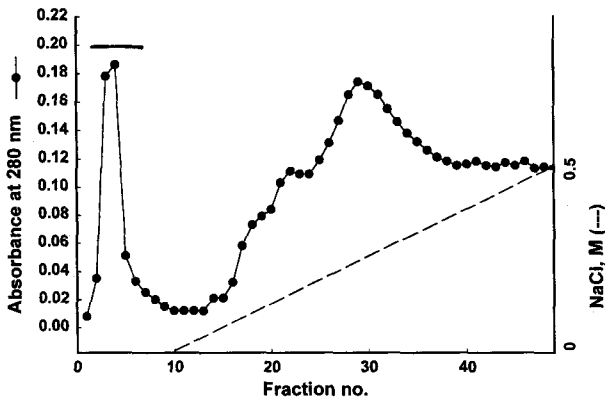


Fig. 1. Elution profiles of fibrinolytic enzyme with DE-52 cellulose column. Fractions containing fibrinolytic activity were pooled, as indicated by bars in the chromatogram.

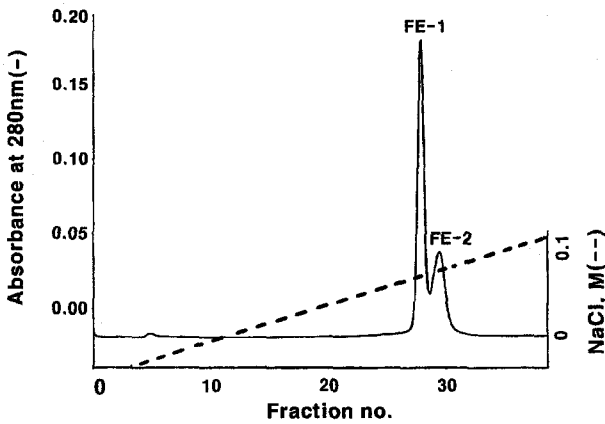


Fig. 2. FPLC chromatogram of purified fibrinolytic enzymes by Mono-S ion exchange column.

혈전용해 효소 중 FE-1과 FE-2가 각각 74%와 26%였으며, 회수율은 9.4%와 4.4%였고, 비활성은 32.7 U/mg과 43.4 U/mg로 FE-2의 비활성이 FE-1의 비활성 보다 크게 나타났다. 이들의 비활성은 뽕나무 버섯(17.02 U/mg), 발효식품인 젓갈(1.4 U/mg), 청국장(1.84 U/mg)의 경우보다 매우 큰 것을 알 수 있다. 두 혈전용해 효소 중 FE-1이 74%로 FE-2에 비

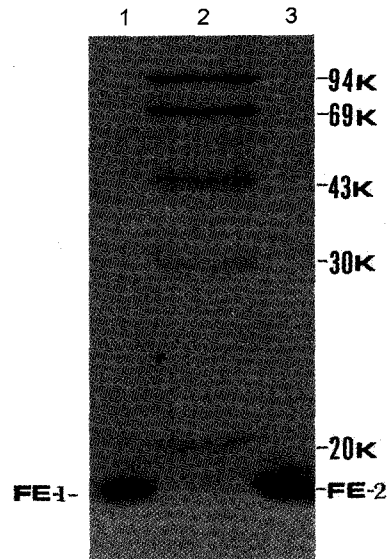


Fig. 3. SDS-PAGE of the purified enzymes. lane 1. FE-1; lane 2. protein marker; lane 3. FE-2.

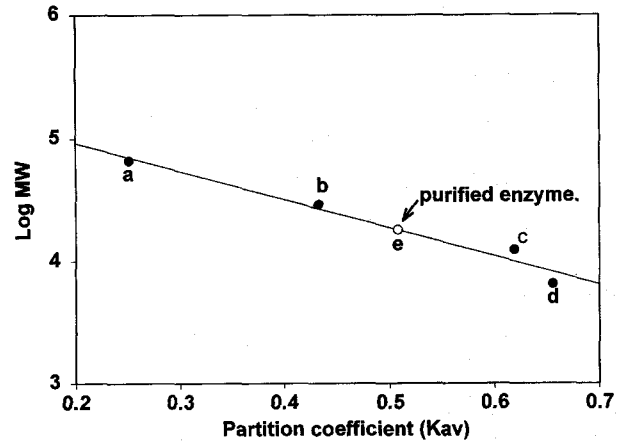


Fig. 4. Molecular weight determination of fibrinolytic enzyme by Sephadex G-150 column chromatography. Bovine serum albumin (66 kDa, a), carbonic anhydrase (29 kDa, b), cytochrom C (12.4 kDa, c), aprotinin (6.5 kDa, d), were used as molecular markers.

해 매우 많이 존재함으로 우선 FE-1의 특성에 대하여 연구 하였다.

정제된 효소는 plasminogen을 포함하는 fibrin plate 뿐만 아니라 plasminogen을 제거한 fibrinogen을 이용하여 만든 fibrin plate에서도 활성을 나타내는 것으로 보아 이 효소는 fibrin을 용해하는데 있어 plasminogen activator(PA)로 작용하지 않고 fibrin을 직접 가수분해하는 혈전용해 효소인 것을 알 수 있다.

분자량 측정

SDS-PAGE 결과 두 혈전용해 효소의 분자량이 각각 18 kDa과 18.2 kDa인 것을 알게 되었으며, gel-filtration의 경우 두 효소는 함께 나왔으며 측정된 분자량은 18 kDa으로 SDS-

PAGE의 결과와 일치하였다(Fig. 3). 또한 SDS-PAGE와 gel-filtration의 결과로부터 이 효소들은 단량체로 이루어진 것을 알 수 있다. 이 효소들의 분자량(18 kDa, 18.2 kDa)은 지금까지 알려진 팽나무버섯(30 kDa), 뱀독(51 kDa), 청국장(28.2 kDa), 젓갈(41 kDa), Shiokara(35 kDa), 팽나무버섯(18.5 kDa), 지렁이(20 kDa), 발효식품인 natto(20 kDa)로부터 분리한 혈전용해 효소에 비하여 작음을 알 수 있다.

금속이온

ICP-MS을 이용하여 FE-1이 갖고 있는 금속의 종류와 양을 측정된 결과 이 효소는 1 mole당 Zn²⁺을 0.98 mole 포함하고 있었다.

N-terminal amino acid 서열 분석

두 혈전용해 효소의 15번째까지 N-terminal amino acid 서열 분석 결과는 A-L-Y-V-G-X-S-P-X-Q-Q-S-L-L-V이었다. 이 결과는 지금까지 발표된 팽나무버섯, 팽나무버섯(Shin and Choi, 1998), 잎새버섯과 느타리버섯(Nonaka *et al.*, 1997) 등의 metalloprotease와 다른 구조의 새로운 효소이다. 같은 N-terminal 구조를 갖고 분자량이 200 Da 차이가 나는 이 FE-1과 FE-2는 같은 효소인데 분자량이 큰 효소의 C-terminal 일부가 잘려 나간 것으로 생각되기도 하며 또한 같은 N-terminal sequencing을 갖는 다른 단백질일 가능성도 전혀 배제할 수 없다. 이와 같은 결과는 지렁이로부터 분리한 혈전용해 효소에서도 나타났다(Park *et al.*, 1998).

최적 pH

기질로 L-lysine pNA을 이용하여 pH 변화에 따른 효소 활성을 조사한 결과 Fig. 5와 같이 pH 7.5에서 최적의 활성을 보여 주었지만 그 이상의 pH에서도 비교적 높은 활성을 유지하였다. 따라서 이 효소는 중성과 염기성에서 활성이 큰 효소로 팽나무버섯과 느타리버섯의 혈전용해 효소와 비슷하였다.

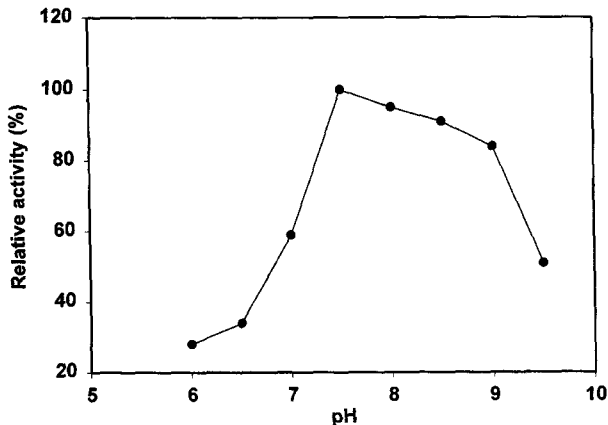


Fig. 5. Effect of pH on the activity of the purified enzyme (FE-1). Activity is expressed as a percentage of maximal activity.

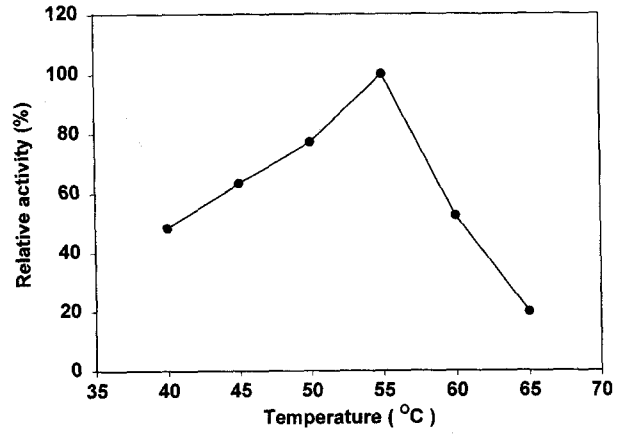


Fig. 6. Effect of temperature on the activity of the purified enzyme (FE-1). Maximal activity was shown as 100%.

최적 온도

효소활성에 미치는 온도영향은 Fig. 6에서와 같이 55°C에서 최대활성을 보였으며 60°C 이상의 온도에서는 활성이 현저히 감소하다가 65°C에서는 20%의 활성만 나타냈으며 70°C 이상에서는 활성을 전혀 나타내지 않았다. 이는 비교적 높은 온도에서 큰 활성을 나타내는 팽나무 버섯과 유사하지만 팽나무버섯이나 *Pleurotus sajor-caju*(Shin and Choi, 1999)의 효소보다는 높은 온도이다.

효소활성에 미치는 금속 2가 이온의 영향

Table 2와 같이 금속 이온을 첨가하지 않았을 때의 활성을 100으로 하여, 상대적인 활성을 측정하였을 때 Co²⁺, Zn²⁺, Mg²⁺, Fe²⁺에 의해서 활성이 약간 증가하였으나 Ca²⁺ 경우는 거의 변화가 없는 반면 Cu²⁺에 의해 급격히 감소하다가 Hg²⁺의 경우는 활성이 나타나지 않았다. 또한 2-mercaptoethanol의 첨가 시 변화가 없는 것으로 보아 disulfide bond가 이 효소의 활성에 중요한 역할을 하지 않는 것으로 생각된다. 그러나 EDTA와 1,10-phenanthroline를 첨가한 경우 효소의 활성이 상당히 저해되는 것으로 보아 이 효소의 활성

Table 2. Effect of various divalent ions on fibrinolytic activity of purified enzyme (FE-1)

Reagents	Concentration	Residual activity (%)
None	1 mM	100
Ca ²⁺	1 mM	99
Co ²⁺	1 mM	124
Zn ²⁺	1 mM	117
Cu ²⁺	1 mM	50
Mg ²⁺	1 mM	105
Fe ²⁺	1 mM	105
Hg ²⁺	1 mM	0
EDTA	1 mM	48
	4 mM	42
1,10-phenanthroline	1 mM	60
	4 mM	0
2-mercaptoethanol	1 mM	100

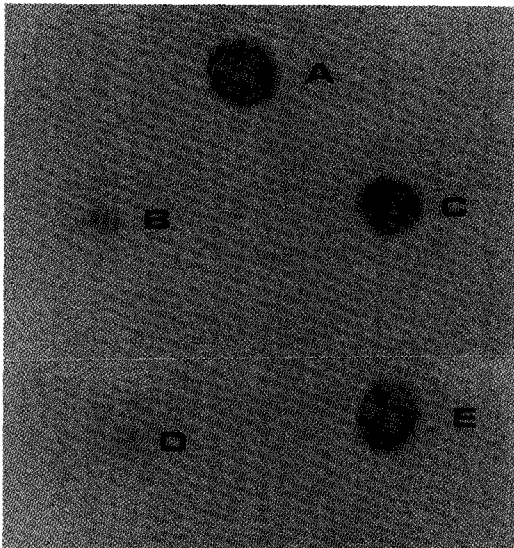


Fig. 7. Fibrinolysis was observed as the incubation time continued. (A) Inactivation occurred with the reaction mixture plus 4 mM 1,10-phenanthroline. (B, D) Inactivation was reactivated by the treatment of 1 mM of CoCl_2 (C), 1 mM of ZnCl_2 (E).

중심에 metal ion을 갖는 metalloprotease로 추정할 수 있는데 ICP-MS의 결과로부터 이 효소는 mole당 Zn^{2+} 을 0.98 mole 포함하고 있는 것으로 밝혀졌다. 이와 같이 혈전용해 효소가 metalloprotease인 많은 경우에 그 활성 중심에 있는 금속 이온은 대부분 Zn^{2+} 이지만 Co^{2+} 의 경우도 알려져 있다 (El-Aassar, 1995). EDTA나 1,10-phenanthroline에 의해 감소된 활성은 Zn^{2+} 나 Co^{2+} 의 첨가에 의해 재생되는 것으로 알려져 있는데 (Shin and Choi, 1998), Fig. 7과 같이 4 mM의 1,10-phenanthroline의 첨가에 의해 사라진 효소 활성이 1 mM의 CoCl_2 와 ZnCl_2 의 첨가에 의해 다시 나타나는 것으로 이를 확인 할 수 있었다.

즉 위와 같은 결과로부터 이 효소는 지금까지 알려진 것과는 다른 새로운 혈전용해 효소로 좀더 많은 임상실험을 거치면 새로운 혈전용해제로 이용 될 수 있으리라 기대된다.

적 요

할미송이버섯으로부터 3단계를 거쳐 분자량이 각각 18 kDa(FE-1)과 18.2 kDa(FE-2)인 두 개의 혈전용해효소를 분리 정제하였다. 이 효소들은 지금까지 알려진 혈전용해 효소의 질량에 비해 비교적 작았고 두 효소(FE-1과 FE-2)의 15번째까지의 N-terminal amino acid 서열은 A-L-Y-V-G-X-S-P-X-Q-Q-S-L-L-V로 같았다. FE-1은 ICP-MS의 결과 Zn^{2+} 을 mole당 0.98 mole 포함하고 있는 metalloprotease로 pH 7.5와 55°C에서 가장 큰 활성을 나타내고, 1,10-phenanthroline의 첨가 시 저하된 활성은 Zn^{2+} 나 Co^{2+} 의 첨가에 의해 재생되었다.

감사의 글

본 연구를 수행하는데 많은 도움을 주신 농촌진흥청의 김양섭 박사님과 석순자 연구원, 기초과학 지원 연구소의 채권석 연구원, 이화용양과 손연주양께도 진심으로 감사를 드립니다.

또한 본 연구는 1999년도 상지대학교 교내연구비의 지원으로 이루어졌음을 밝히며 감사드립니다.

참고문헌

- 김길영. 1998. 임상 지혈 혈전학. 군자출판사. pp. 1-33.
- 김유삼. 1986. 플라즈미노젠 활성화제의 Gene Cloning. 한국생화학회(유전자 재조합 실용화 기술집) pp. 269-298.
- 정광희. 1991. 천연동물 약제로부터의 혈전용해제 연구. 한국 생화학회(산물질 창출을 위한 생물활성연구법). pp. 53-63.
- Chung, K. H. and Kim, D. S. 1992. Fibrinolytic and Coagulation Activities of Korean Snake Venoms. *Kor. Biochem. J.* **25**: 696-701.
- El-Aassar, S. A. 1995. Production and properties of fibrinolytic enzyme in solid state cultures of *Fusarium pallidosorum*. *Biotechnol. Lett.*, **17**: 943-948.
- Gavrilova, V. P. and Falina, N. N. 1975. (Russ) Proteolytic enzyme isolated from a fungus, *Flammulina velutipes* (Fr) Sing. *Mikol. Fitopatol.* **9**: 431-433.
- Haverkate, F. and Traas, D.W. 1974. Dose-response curves in the fibrin plate assay. Fibrinolytic activity of protease. *Thromb. Haemost.* **32**: 356.
- Kim, Y. T., Kim, W. K. and Oh, H. S. 1996. Purification and Characterization of a Fibrinolytic Enzyme Produced from *Bacillus* sp. Strain CK 11-4 Screened from Chungkook-Jang. *Appl. Environm. Microbiol.* 2482-2488.
- Kim, H. K., Kim, G. T., Kim, D. K., Choi, W. A., Park, S. H., Jeong, Y. K. and Kong, I. S. 1997. Purification and Characterization of a Novel Fibrinolytic Enzyme from *Bacillus* sp. KA38 Originated from Fermented Fish. *J. Fermentation and Bioengineering* **84**(4): 307-312.
- Kim, J. H., Lee, H. Y., Yoo, K. H., Kim, Y. S., Seok, S. J. and Kim, Y. S. 1998. The Screening of fibrinolytic activities of extracts from Mushrooms in Mt. Chiak. *Kor. J. Mycol.* **26**(4): 589-593.
- Kim, J. H. and Kim, Y. S. 1998. Purification and characterization of fibrinolytic enzyme from *Armillariella mellea*. *Kor. J. Mycol.* **26**(4): 583-588.
- Kim, S. H. 1998. New trends of studying on potential activities of Doen-Jang. *Korea Soybean Digest.* **15**(1): 8-15.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J. and Randall, A. J. 1951. Protein Measurement with the folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Mihara, H., Sumi, H., Yoneta, T., Mizumoto, H., Ikeda, R., Seiki, M. and Maruyama, M. 1991. A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Jpn. J. Physiol.* **41**: 461.

- Mihara, H., Nakajima, N. and Sumi, H. 1993. Characterization of potent fibrinolytic enzymes in earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Biosci. Biotech. Biochem* **57**(10): 1730.
- Nonaka, T., Dohmae, N., Hashimoto, Y. and Takio, K. 1997. Amino acid Sequences of Metalloendopeptidases specific for Acyl-Lysine bonds from *Grifola frondosa* and *Pleurotus ostreatus* Fruiting Bodies, *J. Biol. Chem.*, **272**: 30032-30039.
- Park, Y. D., Kim, J. W., Min, B. G., Seo, J. W. and Jeong, J. M. 1998. Rapid purification and biochemical characteristics of Lumbrokinase III from earthworm for use as a fibrinolytic agent. *Biotechnol. Lett.* **20**(2): 169-172.
- Reed, G. L., Lin, L. F., Parhaml-Seren, B. and Kussie, P. 1995. Identification of plasminogen binding region in streptokinase that is necessary for the creation of streptokinase-plasminogen activator complex. *Biochemistry* **34**: 10266-10271.
- Shin, H. H. and Choi, H. S. 1998. Purification and Partial Characterization of a Metalloprotease in *Flammulina velutipes*. *J. Microbiol.* **36**: 20-25.
- Shin, H. H. and Choi, H. S. 1999. Purification and Characterization of Metalloproteases from *Pleurotus sajor-caju*. *J. Microbiol. Biotech.* **9**(5): 675-678.
- Sumi, H., Seiki, M., Morimoto, N., Tsushima, H., Maruyama, M. and Mihara, H. 1985. Plasma fibrinolysis after intraduodenal administration of urokinase in rats. *Enzyme* **33**: 121-127.
- Sumi, H., Hamada, H., Tsushima, H., Mihara, H. and Muraki, H. A. 1987. A noble fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto: a typical and popular soybean food in the Japanese diet. *Experientia* **43**: 1110-1111.
- Sumi, H., Nakajima, N., Yatagai, C. 1995. A unique strong fibrinolytic enzyme (katsuwokinase) in skipjack Shiokara, a Japanese traditional fermented food. *Comp. Biochem. Physiol B Biochem Mol Biol.* **112**(3): 543-547.