

쓴송이버섯으로부터 분리한 혈전용해 금속효소의 특성 연구

김준호* · 조승구

상지대학교 이공과대학 화학과

Characterization of a Fibrinolytic Metalloenzyme from a Wild Mushroom, *Tricholoma sejunctum*

Jun-Ho Kim* and Seung Koo Cho

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

(Received July 7, 2004)

Metalloenzyme was purified from the fruiting bodies of *Tricholoma sejunctum*. MALDI-TOF and ICP/MS analyses revealed that the enzyme had a molecular weight of 18788.25 and includes Zn^{2+} ion. The N-terminal amino acid sequence of the enzyme was Ala-Thr-Tyr-Lys-Ile-X-Ser-Ala-Thr-His-Gln-X-X-Leu-Val. The activity of the enzyme was inhibited by EDTA and 1,10-phenanthroline, indicating that the enzyme was a metalloprotease. No inhibition was found with E-64 and pepstatin. It has broad substrate specificity for synthetic peptides. The enzyme was stable up to 40°C. The activity of the enzyme was increased by Zn^{2+} and Co^{2+} , while it was totally inhibited by Hg^{2+} . The enzyme hydrolyzes A α subunit of human fibrinogen but did not show any reactivity for B β and γ form of human fibrinogen.

KEYWORDS: Fibrin plate assay, Fibrinolytic enzyme, *Tricholoma sejunctum*

국내에 약 1500여종이 존재하는 것으로 알려진 버섯은 많은 영양 성분을 포함하고 있어 식품으로 사용될 뿐 아니라 많은 유용 물질을 함유하고 있어 효용 가치가 점점 높아지고 있다. 이들은 항암효과(Kim *et al.*, 1983), 항균 효과(Park *et al.*, 1995), 항산화효과(Stavino, 1997)를 나타내는 물질뿐 아니라 뇌졸중, 뇌혈전증, 심장병과 같은 혈관계 질환에 대한 치료와 예방효과를 나타내는 물질도 포함하고 있는 것으로 알려져 있다(Kubo *et al.*, 1983; Kabir and Kimura, 1989). 혈전에 의해 발생하는 혈관계 질환에 의한 사망률이 종양에 의한 사망률 보다 높아 혈전에 대한 관심이 높아지고 있다. 이 혈전은 혈관내 지혈과정 중 혈소판이 섬유소원과 함께 응집되고 혈소판에서 나온 thrombin에 의해 섬유소원이 섬유소로 변해 생긴 혈액응집체이다. 지혈과정에서 생긴 이 혈전은 조직의 재생 후 혈관내 혈전 용해제인 plasmin에 의해 완전히 용해되지 않을 경우 혈관을 따라 흐르며 혈관계 질환을 유발한다.

팽나무버섯(Shin and Choi, 1998), 뽕나무버섯(Kim and Kim, 1998a, b), 활미송이버섯(Kim, 2000) 등 버섯들은 혈전을 용해하는 효소를 함유하고 있다. 이들 혈전 용해 효소는 기존에 plasminogen 활성화제와 달리 혈전을

직접 용해하는 fibrinolytic enzyme이다. 이런 종류의 효소는 뽕묵(Chung and Kim, 1992)이나 지렁이(Mihara *et al.*, 1993; Park *et al.*, 1998) 등으로부터 분리되기도 했지만 식품인 된장(Kim, 1998), 정국장(Kim *et al.*, 1996), 젓갈(Kim *et al.*, 1997)같은 발효식품에서도 생산되는데, 이 경우 식품들이 포함하고 있는 균주들이 효소를 생산하는 것으로 알려져 있다. 본 실험실의 연구 결과(Kim and Kim, 1998a, b; Kim, 2000)에 따르면 이 식품 효소의 활성 보다는 버섯에서 분리된 효소의 활성이 더 크게 나타났다.

버섯을 이용한 식품은 장기간 섭취가 가능하므로 유효 성분이 미량이라도 항상 공급되어 큰 영향을 줄 수 있을 뿐 아니라 버섯의 균사체로부터 원하는 효소를 대량 생산할 수 있는 장점이 있다. 본 연구에서는 국내에 자생하는 야생버섯 115종(Kim *et al.*, 1998; Kim, 2002)의 혈전 용해능을 조사하고 그 중 활성이 좋은 쓴송이버섯으로부터 혈전 용해 효소를 분리 정제한 후 그 특성을 분석하였다. 쓴송이버섯(*Tricholoma sejunctum*(Sow. ex Fr) Quel)은 여름과 가을에 숲속 땅위에 나는 버섯으로 지름이 4~10 cm로 황색 바탕에 암녹색부터 흑록색을 띠며 동북아와 유럽 북미에 주로 나타나는 식용이 가능한 버섯으로, 이 버섯의 약리활성 효과에 관한 것은 거의 알려져 있지 않지만, 본 실험실에서 의해 혈전용해효소를 함유하고 있음

*Corresponding author <E-mail: jhokim@mail.sangji.ac.kr>

이 확인되었다.

재료 및 방법

공시균주 및 시약

본 실험에 사용한 쓴송이버섯은 2001년 10월 원주 현 계산에서 채집한 버섯 자실체를 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(St. Louis, Missouri 63178; USA) 제품을, DEAE-cellulose는 Whatman(Maidstone; England) 제품을, LMW Electrophoresis calibration Kit는 Pharmacia(Little Chalfont Buckinghamshire; England) 제품을 사용하였다.

혈전용해효소의 정제

모든 정제 과정은 4°C에서 수행하였다. 채집한 버섯 자실체 약 70 g을 20 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0)에 넣고 잘게 부수고 12,000 rpm에서 1시간 원심분리 하여 얻은 상등액을 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.

혈전용해 활성 부분을 모아 1.4 M ammonium sulfate가 포함된 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 완충 용액으로 포화된 Phenyl Sepharose column(HiTrap Phenyl FF: 1 ml)에 흘려 보낸 후 1.4 M-0 M ammonium sulfate의 농도 기울기로 흘러준다. 활성분획을 다시 모아 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. 각 분획의 효소활성을 측정하고 후 활성이 큰 부분을 모아 실험에 사용하였다.

단백질의 정량

효소의 단백질은 Lowry 등(Lowry and Rosenbrough, 1951)의 방법에 의하여 bovine serum albumin을 사용한 표준곡선에 의해 정량하였다.

혈전용해활성의 측정(Fibrin plate assay)

Haverkate-Trass의 fibrin plate법(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 동안 방치하였다. 효소에 의해 fibrin막이 용해되면 용해면적을 측정하여 상대적인 활성

을 측정하였다. 표준대조구로는 plasmin을 사용하였다. plasmin을 연속적으로 희석하여 얻은 표준곡선에 따라 활성을 계산하였다. Fibrin plate는 plasminogen이 제거된 fibrinogen과 plasminogen이 포함된 fibrinogen을 이용하여 두 가지 방법으로 준비하였다.

분리한 혈전용해 효소(TSFE)의 이화학적 특성조사

분자량 결정. 단백질의 분자량은 전기영동과 MALDI-TOF/MS(Voyager-DE STR, Perseptive Biosystems)을 이용하여 결정하였으며, gel은 coomassie blue R-250과 silver staining kit (Pharmacia사 Little Chalfont Buckinghamshire; England)로 염색하였다. MALDI-TOF/MS 에 의한 분자량 측정은 기초과학 지원연구소(대전)에서 수행하였다.

N-terminal amino acid analysis. 분리된 효소의 아미노산 서열은 기초과학 지원연구소(서울)의 precise protein sequencing system(Applied Biosystems Model Procise-491)을 사용하여 결정하였다.

금속 이온의 종류. 분리한 효소가 갖고 있는 금속의 종류와 양은 상지대학교 자연과학지원센터의 Ultra mass 700 inductively coupled plasma mass spectrometer(ICP-MS, Ultramass 700, Varian)를 이용하여 측정하였다.

기질 선택성 조사. 정제된 효소의 기질에 대한 선택성을 조사하기 위해 합성된 p-nitroaniline를 포함하는 펩티드 기질들을 사용하였다. 3 mM 기질용액 50 μ l에 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.0) 925 μ l와 효소 25 μ l를 넣고 섞은 후 405 nM에서 흡광도 변화를 측정한다. 사용한 기질로는 D-Phe-Pip-Arg pNA, N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe pNA, Phe-Ala pNA, Ala pNA, Lys pNA, Pro pNA, Gly pNA, Glu pNA, Leu pNA 등이 있다.

열 안정성 조사. 20°C부터 80°C까지 각각 1 시간 동안 열처리한 후 이 시료들을 점적한 fibrin plate를 36°C의 온도로 유지된 oven에 8시간 동안 방치한 후 용해된 면적을 측정하고 가장 넓게 용해된 경우를 100%로 하고 이에 대한 상대적인 넓이의 비를 %로 나타낸다.

효소활성에 미치는 금속 2가 이온과 효소 저해제의 영향. 정제한 효소의 활성에 대한 금속 이온과 효소 저해제의 영향을 알아보기 위하여 2 mM의 CaCl₂, CoCl₂, ZnCl₂, CuSO₄, MgCl₂, FeCl₂, HgCl₂, EDTA, 1,10-phenanthroline과 단백질 분해효소 저해제인 PMSF, E-64과 0.4 mM의 Pepstain A을 같은 부피의 혈전용해효소 용액과 섞은 후 fibrin plate에 점적 하고 36°C incubator에서 8시간 동안 방치한 후 용해된 면적을 측정하여 활성을 비교하였다.

혈전용해효소에 의한 섬유소원의 분해 양상. 분리한 효소(1.3 μ g/ml)와 섬유소원(2 mg/ml)를 36°C에서 반응시키면서 일정한 시간 간격을 두고 반응 액 일부를 취하여 전기영동을 행하여 섬유소원의 분해과정을 분석하였다.

Table 1. Purification of fibrinolytic enzyme from *Tricholoma sejunctum*

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg protein)	Recovery (%)	Purification fold
Extract	304	37.696	0.124	100	1
DEAE-cellulose	1.895	3.891	2.053	10.32	16.556
Phenyl sepharose	0.222	0.773	3.482	2.051	28.065
Mono S (FPLC)	0.012	0.137	11.417	0.365	92.339

결과 및 고찰

혈전용해 효소의 정제

3 단계를 거쳐 쓴송이 버섯으로부터 혈전용해효소 (TSFE)를 분리 정제하였다(Table 1). 활성을 갖는 대부분의 효소는 DEAE-cellulose관에 붙지 않고 흘러 나왔다. 이 활성 부분을 모아 Phenyl Sepharose관을 이용하여 분리한 결과 ammonium sulfate의 낮은 농도에서 활성 부분이 나타났다. 이를 다시 FPLC의 Mono S column을 이용하여 분리한 활성 분획은 SDS-PAGE 위에서 분자량 17.1 K Da의 단일 band로 나타났다(Fig. 1). 한편 MALDI-TOF/MS를 이용한 결과 최종 분자량은 18788.25 Da 이었기 때문에(Fig. 2) 이 효소는 단량체로 이루어진 것을 알 수 있었다. 최종 단계에서 분리한 혈전용해효소는 비활성이 11.42 U/mg으로 지금까지 발표된 혈전 용해 효소들과 비교할 때 이미 발표된 뽕나무 버섯(17.02 U/mg), 할미송이버섯(32.7 U/mg) 보다는 적지만, 젓갈(1.4 U/mg), 청국장(1.84 U/mg)으로부터 분리한 효소들 보다 매우 큰 것을 알 수 있었다. 또한 분자량(18.8 kDa)은 팽나무버섯(30 kDa), 뱀독(51 kDa), 청국장(28.2 kDa), 젓갈(41 kDa), 지렁이(20 kDa)로부터 분리한 혈전용해 효소에 비하여 작고 뽕나무버섯(18.5 kDa)과 할미송이버섯(18.1 kDa)의 효소와 비슷함을 알 수 있다. 정제한 효소는 plasminogen을 포함하는 fibrin plate 뿐만 아니라 포함하지 않은 fibrin plate에서도 같은 활성을 나타냈다. 이는 이

효소가 plasminogen activator가 아니라 fibrin plate를 직접 용해하는 fibrinolytic enzyme임을 나타내는 것이다.

N-terminal amino acid 서열 분석

이 효소의 N-terminal amino acid 서열 분석 결과는 Ala-Thr-Tyr-Lys-Ile-X-Ser-Ala-Thr-His-Gln-X-X-Leu-Val 이었다. 이 결과를 GENBANK SwissPort에서 비교한 결과 지금까지 발표되지 않은 새로운 효소임을 확인하였다. 지금까지 발표된 뽕나무버섯(Kim and Kim, 1998a, 1999b), 할미송이버섯(Kim, 2000), 팽나무버섯(Shin and Choi, 1998), 잎새버섯과 느타리버섯(Nonaka *et al.*, 1997) 등의 metalloprotease와 비교할 때 그 구조적인 차이점을

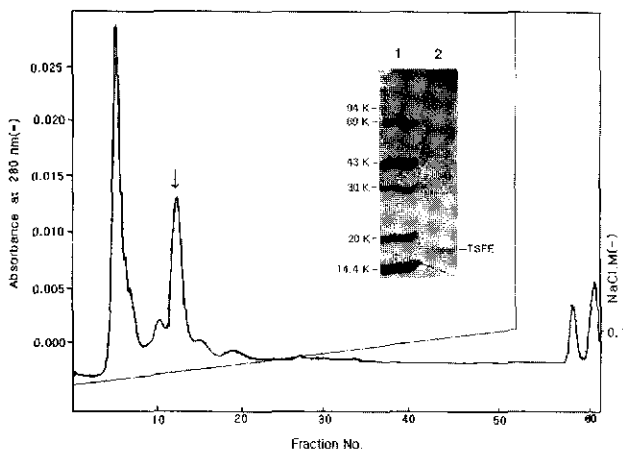


Fig. 1. FPLC and electrophoregram of the purified enzyme. lane 1. molecular mass marker, lane 2. purified enzyme.

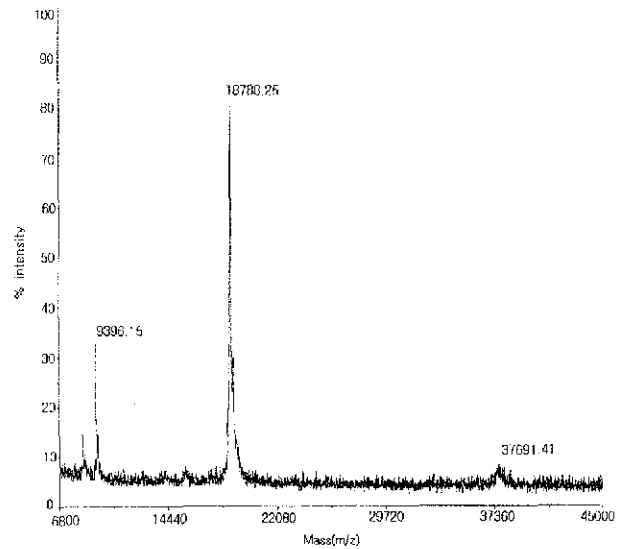


Fig. 2. MALDI-TOF spectra of purified enzyme.

P	O	S	M	E	P	A	T	F	V	G	G	S	A	T	R	Q	T	Q	L	N
G	F	R	M	E	P	T	Y	N	G	G	S	S	S	E	Q	S	A	L	A	
A	M	E	M	E	P	X	X	V	N	G	X	T	X	S	R	Q	T	T	L	V
T	S	A	M	E	P	A	L	Y	V	G	X	S	P	X	Q	Q	S	L	L	Y
T	S	E	M	E	P	A	T	Y	K	I	X	S	A	T	I	Q	X	X	L	V

Fig. 3. N-terminal amino acid sequences of mushroom metalloendopeptidases. POSMEP, *Pleurotus ostreatus* metalloendopeptidase; GFRMEP, *Grifola frondosa* metalloendopeptidase; AMEMEP, *Armillariella mellea* metalloendopeptidase; TSAMEP, *Tricholoma saponaceum* metalloendopeptidase; TSEMEP, *Tricholoma sejunctum* metalloendopeptidase.

알 수 있다(Fig. 3).

분리한 혈전용해효소(TSFE)의 이화학적특성

금속이온. ICP-MS을 이용하여 분리한 효소가 갖고 있는 금속의 종류와 양을 측정한 결과 이 효소는 1 mole당 Zn²⁺을 0.83 mole 포함하고 있었다. 이는 Zn 을 포함하고 있는 뽕나무 버섯, 할미송이 버섯, 팽나무버섯 버섯과 같이 그 활성 중심에 금속이온 Zn²⁺을 갖는 metalloprotease 이다.

기질 선택성 조사. 사용한 합성 기질들에 대해 다양한 기질특이성을 나타냈다. Lys pNA를 강하게 분해시켰고, D-Phe-Pip-Arg pNA와 N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe pNA는 중간 정도의 세기, Gly pNA, Leu pNA 는 약하게 Ala pNA, Phe-Ala pNA, Glu pNA, Pro pNA는 아주 느리게 분해가 이루어졌다. 또한 fibrin과 fibrinogen을 분해함을 확인하였다(Table 2).

열 안정성 조사. 40°C까지는 변화를 보이지 않다가 50°C에서 서서히 감소하기 시작하여 60°C에서 급격히 감소하다 70°C에서 거의 활성이 사라짐을 확인하였다(Fig. 4).

Table 2. Substrate specificity of protease in *Tricholoma sejunctum*

Substrate	Relative activity (%)
D-Phe-Pip-Arg pNA	41
N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe pNA	57
Phe-Ala pNA	9
Gly pNA	24
Ala pNA	11
Leu pNA	23
Lys pNA	100
Pro pNA	7
Glu pNA	7
Fibrin	+
Fibrinogen	+

+, positive hydrolysis.

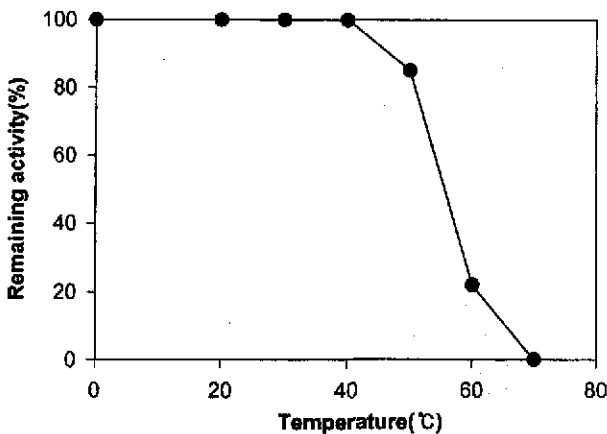


Fig. 4. Thermal stability of fibrinolytic activity of the purified protease.

효소활성에 미치는 금속 2가 이온과 단백질 분해효소 저해제의 영향. Table 3와 같이 Co²⁺, Zn²⁺의 경우 활성이 증가하였으나 Ca²⁺ 경우는 약간 감소한 반면 Cu²⁺와 Fe²⁺에 의해 급격히 감소하다가 Hg²⁺의 경우는 활성이 나타나지 않았다. 단백질분해효소 저해제에 대한 영향을 조사한 결과 serine protease 저해제인 PMSF에 의해서는 약간 감소했으나 cystein protease 저해제인 E-64와 aspartic protease 저해제인 pepstain에 의해서는 거의 효소활성이 영향을 받지 않았다. 그러나 EDTA와 1,10-phenanthroline를 첨가한 경우 전혀 활성이 나타나지 않았다. 이 결과로 미루어 이 효소는 금속 단백질 효소인 것을 예측할 수 있다.

혈전용해효소에 의한 섬유소원의 분해 양상. 정제된 효소와 섬유소원(fibrinogen)의 반응 시 시간별로 취한 반응액을 SDS-PAGE로 분석한 결과 Aα chain은 20분 후에 완전히 분해되지만, Bβ chain과 γ chain은 60분 경과하여도 분해하지 못했다(Fig. 5).

최근 뇌출혈, 심부전증, 심장마비와 같은 혈관계 질환에 의한 사망률이 증가함에 따라 이들 질병의 원인 중 하나인 혈전에 관한 관심이 증가하고 있다. 기존에 사용되고 있는 혈전용해제들은 가격도 비싸지만, 면역반응이나 전

Table 3. Effects of various divalent ions and protease inhibitor on protease activity

Reagent	Concentration (mM)	Residual activity (%)
None	1	100
Ca ²⁺	1	90
Co ²⁺	1	122
Zn ²⁺	1	145
Cu ²⁺	1	43
Mg ²⁺	1	97
Fe ²⁺	1	52
Hg ²⁺	1	0
PMSF	1	93
Pepstain A	0.2	104
E-64	1	98
1,10-phenanthroline	1	0
EDTA	1	0

E-64 : trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)-butane.

PMSF : phenylmethylsulfonyl fluoride.

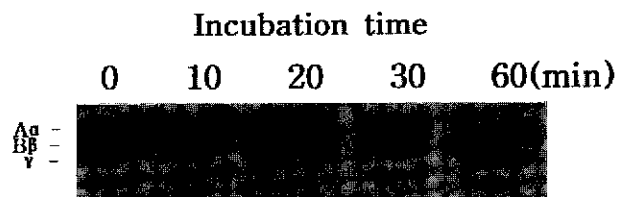


Fig. 5. Degradation of human fibrinogen by fibrinolytic enzyme. Purified enzyme (1.3 μg/ml) was incubated with fibrinogen (2 mg/ml) at 36°C in 20 mM sodium phosphate, pH 7.0.

신 출혈과 같은 부작용이 나타나는 단점이 있어 이를 극복할 수 있는 새로운 혈전 용해제 개발에 관심이 커지고 있다.

혈전성 성인병은 병징이 나타나기 시작한 후에는 치료가 매우 어려운 한계가 있어 혈전을 감소시키는 식품이나 약품을 상시 섭취하여 혈전에 의한 성인병을 미리 예방하는 것이 최선의 방법이다. 따라서 생성된 혈전을 제거할 수 있는 혈전용해 물질을 함유하고 있는 재료를 식품으로 사용하여 항상 사용할 수 있다면 혈전증 치료에 큰 효과를 얻을 수 있을 것이다. 이와 같은 조건을 갖고 있는 것이 버섯이다(Gavrilova and Falina, 1975). 칩엽수림과 활엽수림에 자생하는 야생 버섯인 쓴송이버섯은 식용 가능하며 활성이 좋은 혈전용해효소를 함유하고 있다(Kim *et al.*, 1998; Kim, 2002). 이 버섯으로부터 분리한 혈전용해효소(TSFE)는 기존에 사용되고 있는 혈전 용해제들과는 달리 혈전의 주성분을 직접 분해하는 fibrinolytic enzyme 이었다. 이 효소(TSFE)는 뽕나무버섯(Kim and Kim, 1998a, b)이나 활미송이버섯(Kim, 2000)으로부터 분리한 효소보다 활성은 작지만 분자량은 비슷하며, 발효식품인 젓갈(Kim *et al.*, 1997), 청국장(Kim *et al.*, 1996)으로부터 분리한 효소들보다는 활성이 크고 분자량은 작았다. 분자량이 작을 경우에는 혈전용해제로 사용 시 흡수가 빠른 장점이 될 수 있다. 활미송이버섯으로부터 분리한 혈전 용해효소의 활성은 매우 크지만 활미송이버섯은 약간의 독성을 갖고 있으며, 뽕나무버섯의 경우는 식용 가능하지만 야생에서 대량 재배 시 버섯 균사가 사냥기생과 더불어 활물 기생도 하므로 다른 나무의 성장에 피해를 줄 수 있다. 이와 같이 독성도 없고, 대량 재배 시 다른 나무에 피해를 주지 않는 식용 가능한 쓴송이버섯이 식품으로 이용되어 자주 섭취할 수 있다면 혈전에 의한 혈관계 질환의 예방과 치료에 큰 효과를 볼 수 있을 것이다. 또한 쓴송이버섯이 함유하고 있는 혈전 용해효소는 분자량이 작고, 활성이 큰 장점을 갖고 있어, 정밀한 독성 검사나 다른 혈장 단백질에 대한 선택성 조사와 같은 좀더 많은 임상 실험을 통해 좋은 결과를 얻고, 기존의 혈전용해제들의 단점을 극복할 수 있다면 새로운 혈전용해제로 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

적 요

쓴송이버섯으로부터 분리한 혈전용해효소(TSFE)의 활성은 11.42 U/mg이었으며, N-terminal amino acid 서열은 Ala-Thr-Tyr-Lys-Ile-X-Ser-Ala-Thr-His-Gln-X-X-Leu-Val로 지금까지 발표되지 않은 새로운 효소였다. MALDI-TOF와 ICP/MS로 분자량은 18788.25 Da이며, Zn²⁺을 함유하는 금속효소임을 알게 되었다. 이 효소는 40°C까지 열에 안정하고, 특히 합성된 기질 Lys pNA를 강하게 분해하였다. Zn²⁺와 Co²⁺에 의해 활성이 증가되고, EDTA,

1,10-phenanthroline, Hg²⁺에 의해서는 활성이 완전히 소멸되었다. 이 효소는 섬유소원의 A α chain은 분해하지만, B β chain과 γ chain은 분해하지 못했다

감사의 글

본 연구는 2002년도 상지대학교 교내 연구비의 지원으로 이루어졌음을 밝히며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Chung, K. H. and Kim, D. S. 1992. Fibrinolytic and cogulation activities of Korean snake venoms. *Kor. Biochem. J.* **25**: 696-701.
- Gavrilova, V. P. and Falina, N. N. 1975. 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**: 356-365.
- Kabir, Y. and Kimura, S. 1989. Dietary mushrooms reduce blood pressure in spontaneously hypertensive rats (SHR). *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **35**: 91-94.
- Kim, B. K., Kim, J. S., Choi, E. C., Kim, H. R., Lee, K. L., Lee, C. O., Chung, K. S. and Shim, M. J. 1983. Studies on constituents of the higher fungi of Korea (XX VII). *Kor. J. Mycol.* **11**: 151-157.
- 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. Ferment. Bioeng.* **84**(4): 307-312.
- Kim, J. H. 2000. Purification and characterization of fibrinolytic enzymes from *Tricholoma saponaceum*. *Kor. J. Mycol.* **28**: 60-65.
- Kim, J. H. 2002. The screening test of wild mushroom extracts for fibrinolytic activity. *Kor. J. Biomed. Lab. Sci.* **8**(3): 173-177.
- 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, J. H. and Kim, Y. S. 1999. A fibrinolytic metalloprotease from the fruiting bodies of an edible mushroom, *Armillariella mellea*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **63**(12): 2130-2136.
- Kim, S. H. 1998. New trends of studying on potential activities of Doen-Jang. *Korea Soybean Digest* **15**(1): 8-15.
- 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 ChungkookJang. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2482-2488.
- Kubo, M., Tatsuda, H., Nogami, M., Arichi, S. and Takahashi, T. 1983. Studies on the *Ganoderma lucidum* (IV), effects on the disseminated intravascular coagulation. *Yakugaku Zasshi* **103**: 871-877.

- 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., 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, S. S., Lee, K. D. and Min, T. J. 1995. Study on the screening and development of antibiotics in the mushrooms. The screening of bacterial antibiotics in Basidiomycetes (I). *Kor. J. Mycol.* **23**(1): 28-36.
- 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.
- Shin, H. H. and Choi, H. S. 1998. Purification and partial characterization of a Metalloprotease in *Flammulina velutipes*. *J. Microbiol.* **36**: 20-25.
- Stavinoha, W. B. and Satsangi, N. 1997. The 7th international symposium on the *Ganoderma lucidum*. Seoul, Korea, 11 June. p. 5-17.