

민자주방망이버섯으로부터 혈전용해효소의 정제 및 특성 연구

김 준 호*

상지대학교 이공과대학 화학과

Purification and Characterization of Fibrinolytic Enzyme from *Lepista nuda*

Jun-Ho Kim*

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

(Received November 22, 2005)

ABSTRACT: A Fibrinolytic enzyme has been isolated and purified from the edible mushroom, *Lepista nuda*. The apparent molecular mass of purified enzyme was estimated to be 34 KDa by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The N-terminal amino acid sequence of the enzyme was Tyr-Pro-Ser-Pro-Ser-His-Gln-Thr-Ala-Val-Asn-Ala-Ile-Ile-X. It has a pH optimum at 7.0~9.5, suggesting that the purified enzyme is an alkaline protease. It shows the maximum fibrinolytic activity at 55°C. The fibrinolytic activity was inhibited by phenylmethylsulfonyl fluoride, indicating that the purified enzyme is a serine protease. The activity of the purified enzyme was totally inhibited by Hg²⁺.

KEYWORDS: Fibrin plate assay, Fibrinolytic enzyme, *Lepista nuda*

버섯들이 가지고 있는 영양 성분 중에는 건물 중 47~83%가 탄수화물이고, 17~35%이 단백질로 육류보다는 낮지만 다른 식품에 비해 함량이 높은 편으로 특히 9가지의 필수 아미노산이 풍부하며, 1.1~8.3%의 지방을 포함하지만 특히 지방산 중 우리 생활에 필수적인 불포화 지방산의 비율이 포화 지방산 보다 훨씬 높다. 이런 이유로 지금까지 버섯은 주로 식용으로 사용되어 왔으나 근래에는 의약용으로 크게 활용되기 시작하였다. 특히 치료용으로 효용가치가 높게 평가되기 시작한 것은 동물실험과 함께 임상증례를 발표함에 따라 더 이용가치가 있음을 증명하기에 이르렀다. 이 의용버섯은 균주를 배양함으로써 대량 생산체제를 이룩할 수 있고 식용이나 의료용으로 장기간 복용하였을 때 부작용이 거의 나타나지 않아서 다른 장기에 손상을 주지 않는 이점이 있다.

버섯류들이 오래전부터 식용이나 약용으로 많이 복용되어 왔으나 대부분이 야생 그대로 채취하여 사용되어져 있었다. 한국에는 약 1,500여종의 버섯이 존재하는 것으로 보고되고 있으며, 이 중 400여종이 식용이나 약용으로 이용가능 한 것으로 알려져 있다(안, 1992).

버섯류가 가지고 있는 여러 가지 약리 작용 중에는 항암작용(김 등, 1983), 항균 효과(박 등, 1995), 항산화작용(Stavino, 1997), 항바이러스 효과, 혈당 강하효과, 콜레스테롤 저하 효과, 항 혈전효과, 혈소판응집억제작용, 노화

억제 등이 알려져 있으며(Kubo *et al.*, 1983; Kabir and Kimura, 1989) 또한 사망 원인 중 가장 큰 비중을 차지하는 혈관계 질환의 주원인인 혈전을 용해하는 성분도 포함하고 있다.

혈관 벽이 손상되어 출혈이 일어나면 혈소판과 섬유소원이 응집하고 이 혈소판에서 나온 thrombin이 섬유소원을 섬유소로 만들어 혈소판과 섬유소의 응집체인 섬유소혈전(fibrin clot)이 형성되어 출혈을 막게 된다. 이때 생긴 혈전이 조직의 재생 후 완전히 용해가 되지 않으면 혈관을 따라 흐르며 혈관계 질환을 초래 한다(Daka and Semba, 1995). 따라서 혈관계 질환은 혈전을 용해시킴으로써 치료할 수 있다.

현재 사용되고 있는 혈전용해제로는 urokinase와 tPA와 streptokinase가 있는데 이들은 혈전에 대한 선택성이 적어 장기간 복용 시 용혈현상이라든가 면역반응과 같은 부작용을 나타내고 있어 새로운 혈전용해제의 개발이 필요하게 되었다. 근래에 혈전과 섬유소원을 직접 용해하는 효소를 뱀독(Chung and Kim, 1992)과 지렁이(Mihara *et al.*, 1993; Park *et al.*, 1998)로부터 분리정제 하였다는 보고가 있으며 또한 식품 중에서도 이 혈전용해 물질을 찾고자하는 연구가 진행되고 있는데 이런 식품으로는 발효식품인 청국장(Kim *et al.*, 1996), 된장(김, 1998), 젓갈(Kim *et al.*, 1997) 등이 있다.

식용버섯인 *Flammulina velutipes*(Fr) Sing에 섬유소(fibrin)를 분해하는 단백질 분해효소가 있다는 Gavrilova

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

등의 보고(Gavrilova and Falina, 1975)에 따라 치악산에 자생하는 버섯 65종과 원주 근교 현계산 등에서 채집한 버섯의 50종의 fibrin 분해활성을 검색 후 발표한 바 있다(김 등, 1998; Kim *et al.*, 2002). 이들 보고에 따라 활성이 큰 뽕나무버섯(Kim and Kim, 1999)과 할미송이버섯(Kim and Kim, 2001), 쓴송이버섯(Kim, 2002)으로부터 혈전용해효소를 분리 정제하고 그 특성을 발표하였으며, 본 연구에서는 혈전 용해능이 큰 버섯으로 알려진 민자주방망이버섯으로부터 혈전용해 효소를 분리 정제하고 그 특성을 연구하여 결과를 발표하고자 한다. 민자주방망이버섯은 우리나라를 포함한 북반구 일대와 호주 등에 분포하며 늦가을부터 초겨울에 걸쳐 잡목림이나 죽림 내 땅위에 나며 균류를 만들며 맛과 향이 뛰어나 구미나 중국 등지에서 식용으로 널리 이용되고 있으며, 항종양 작용도 높은 것으로 알려져 있다. 또한 본 연구에 의해 활성이 높은 혈전용해효소도 함유하고 있는 것으로 밝혀졌다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 버섯시료는 2004년 9월 오대산에서 채집하여 분류동정 후 시료로 사용하였다. 시약으로 사용한 fibrinogen, plasmin(P 4895, 3 units), thrombin, bovine serum albumin, agarose, glycine, Sephadex G-150와, protease inhibitor는 Sigma(St. Louis, MO, U.S.A.) 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 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 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 용출 시켰다.

활성 부분을 모아 PM 10 막을 사용하는 ultrafiltration(Amicon : a Grace company, Beverly, U.S.A)에 의해 농축시키고 이를 1.4 M ammonium sulfate를 포함하는 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 완충 용액으로 포화된 Phenyl Sepharose column(Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden; HiTrap Phenyl FF: 1 ml)에 흘려 보낸 후 1.4~0 M ammonium sulfate의 농도 기울기로 흘려주고 활성부분은 모아 20 mM sodium phosphate 완충액(pH 6.0)에 투석시킨 후 동일한 완충 용액으로 미리 평형

시킨 fast protein liquid chromatography(FPLC : Water corporation, Milford, U.S.A)의 Mono S column(5.0×100 mm)에 주입하였다. 이를 완충 용액 3 ml로 씻어 준 후 0~0.1 M NaCl 농도 기울기로 용출 시켰다. 각 분획의 효소활성을 측정 후 활성이 큰 부분을 모아 실험에 사용하였다.

단백질의 농도 측정

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

혈전용해활성의 측정

Haverkata-Trass의 fibrin plate법(Haverkata and Traas, 1974)에 따라 2% gelatin용액에 녹인 0.7%(w/v) fibrinogen 용액 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 plasmin을 연속적으로 희석하여 얻은 표준곡선에 따라 활성을 계산하였다.

분자량 결정

분리한 단백질의 순도와 분자량은 전기영동을 실시하여 결정하였으며 전기영동은 4.5%의 stacking gel과 12%의 separating gel로 이루어진 SDS-PAGE를 사용하였다. Gel 은 Coomassie brilliant blue R-250로 염색하였으며, 표준 단백질로는 phosphorylase b(94 kDa), bovine serum albumin(BSA)(67 kDa), ovalbumin(43 kDa), carbonic anhydrase(30 kDa), soybean trypsin inhibitor(20.1 kDa) α -lactalbumin(14.4 kDa)를 사용하였다.

N-terminal amino acid analysis

분리된 효소의 amino acid sequencing은 기초과학지원 연구소(서울)에 precise protein sequencing system(Applied Biosystem Model precise-491)을 사용하여 수행되었다.

최적 pH

효소의 활성에 미치는 pH의 영향은 완충용액으로 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 5.0~7.5), 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 8.0~9.5), 0.1 M carbonate-bicarbonate buffer(pH 10~10.5)를 사용하였고 기질로 N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe 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 l를 넣고 섞은 후 405 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다.

Table 1. Purification of fibrinolytic enzyme from *Lepista nuda*

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg protein)	Recovery (%)	Purification fold
Extract	22285.6	2304	0.103	100	1
DEAE-cellulose	96	253	2.635	10.98	25.58
Phenyl Sepharose	9.54	142	14.88	6.16	144.46
Mono S (FPLC)	3.45	78.6	22.78	3.41	221.16

최적온도

Fibrin plate 방법을 이용하여 온도 변화에 따른 효소의 활성도 변화를 측정하였다. 30°C에서 70°C까지 배양기의 온도를 변화시키며 효소를 점적한 plate를 넣고 3시간 후에 plate의 용해면적을 측정하여 효소의 활성을 비교하였다.

효소활성에 미치는 금속 이온과 효소 저해제의 영향

정제한 효소의 활성에 대한 금속 이온의 영향과 효소 저해제의 영향을 알아보기 위하여 2 mM의 CaCl_2 , CoCl_2 , ZnCl_2 , CuSO_4 , MgCl_2 , FeCl_2 , HgCl_2 , EDTA, 1,10-phenanthroline과 단백질 분해효소 저해제인 PMSF(phenyl methyl sulfonyl fluoride), E-64와 0.4 mM의 Pepstatin A를 같은 부피의 혈전용해효소 용액과 섞은 후 fibrin plate에 점적 하고 36°C 배양기에서 8시간 후 용해된 면적을 측정하여 활성을 비교하였다.

결과 및 고찰

혈전용해효소의 정제

민자주방망이버섯으로부터 3 단계를 거쳐 혈전용해효소를 분리 정제하였다(Table 1). 효소용액을 DEAE-cellulose관에 주입한 결과 활성을 갖는 대부분의 효소는 관에 붙지 않고 흘러 나왔다(Fig. 1). 이 활성 부분을 모아

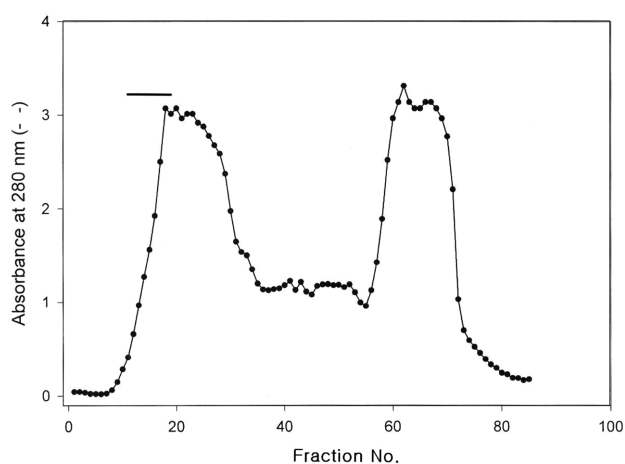


Fig. 1. Elution profiles of fibrinolytic enzyme with DE-52 cellulose column. Fractions containing fibrinolytic activity were pooled, as indicated by bars in the chromatogram.

Phenyl Sepharose 관을 이용하여 분리한 결과 ammonium sulfate 0.7 M 부근에서 활성 부분이 나타났으며(Fig. 2) 이를 다시 FPLC의 Mono S column을 이용하여 분리한 결과(Fig. 3), 활성 부분의 SDS-PAGE는 분자량이 30.1 K Da으로 단일 띠를 나타냈다(Fig. 4). 최종 단계에서 분리한 효소의 비활성은 22.78 U/mg으로 발표된 할미송이버섯(32.7 U/mg) 보다는 적지만 뽕나무버섯(17.02 U/mg), 쓴송이버섯(17.02 U/mg) 보다 크고 젓갈(1.4 U/mg), 청국장(1.84 U/mg)으로부터 분리한 효소들 보다는 매우 큰 것을 알 수 있었다. 분리한 효소의 분자량 34 KDa은 뱀독

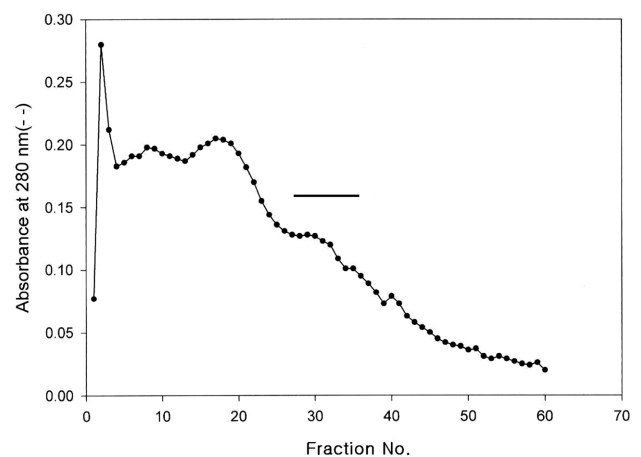


Fig. 2. Elution profiles of fibrinolytic enzyme with Phenyl Sepharose column. Fibrinolytic active fractions were indicated by bars in the chromatogram.

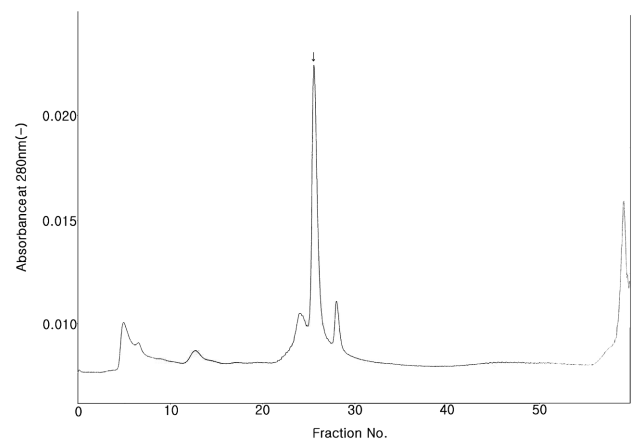


Fig. 3. FPLC chromatogram of the purified fibrinolytic enzyme of *L. nuda* by Mono-S ion exchange column.

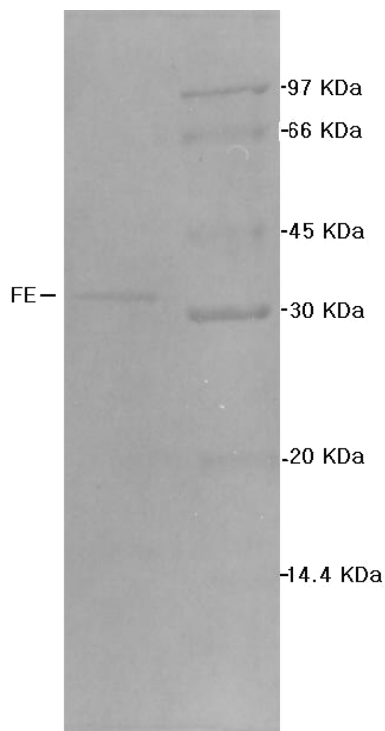


Fig. 4. SDS-PAGE of the purified enzyme from *Lepista nuda*. Lane 1, fibrinolytic enzyme (FE); lane 2, protein marker.

(51 KDa), 젓갈(41 KDa)의 효소 보다는 작지만 팽나무버섯(30 KDa)으로부터 분리한 효소보다 조금 크고, 청국장(28.2 KDa), 지렁이(20 KDa), 뽕나무버섯(18.5 KDa)과 할미송이버섯(18.1 KDa)으로부터 분리한 혈전용해 효소에 비하여 크을 알 수 있다. 정제한 효소는 plasminogen을 포함하는 fibrin plate 뿐만 아니라 포함하지 않은 fibrin plate에서도 같은 활성을 나타냈다. 이는 이 효소가 plasminogen activator가 아니고 fibrin plate를 직접 용해하는 fibrinolytic enzyme임을 나타내는 것이다(김, 1998).

N-terminal amino acid 서열 분석

이 효소의 15번째까지 N-terminal amino acid 서열 분석 결과는 Tyr-Pro-Ser-Pro-Ser- His-Gln-Thr-Ala-Val-Asn-Ala-Ile-Ile-X 이었다. 이 서열을 GENBANK SwissPort에서 비교한 결과 기존에 알려진 혈전용해 효소의 아미노산 서열과 유사성을 높게 나타내지 않았다.

최적 pH

기질로 N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe pNA를 이용하여 pH 변화에 따른 효소 활성을 조사한 결과 Fig. 5와 같이 pH 7.0에서 9.5까지 넓은 범위에서 높은 활성을 보여 주는 alkaline protease로 나타났다. 뽕나무버섯(Kim and Kim, 1999)은 pH 7.0에서 최적의 활성을 나타내는 중성의 효소였으나 할미송이버섯(Kim and Kim, 2001)은 pH 7.5에서, 쓴송이버섯(Kim, 2002)은 pH 9.5에서 가장 활성이 좋은

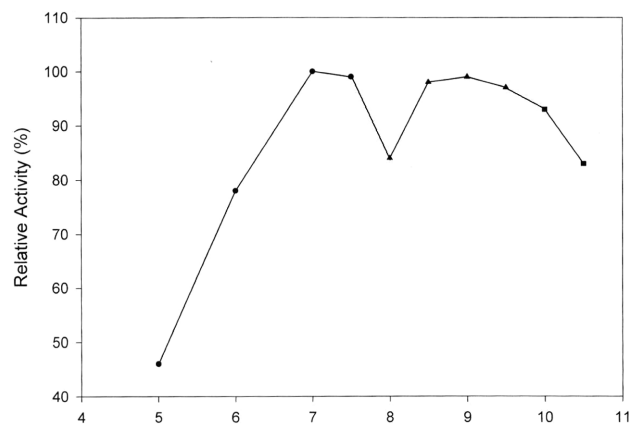


Fig. 5. Effect of pH on the fibrinolytic activity of purified enzyme from *Lepista nuda*. 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 5.0~pH 7.5), 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0~pH 9.5), and 0.1 M carbonate-bicarbonate buffer (pH 10.0~pH 10.5) were used with L-lysine-pNA substrate. The maximum activity was expressed as 100%.

alkaline protease였다. 그러나 민자주방망이버섯은 pH 7.0부터 pH 9.5의 넓은 영역에서 높은 활성을 나타내는 alkaline protease였으나 pH 8.0에서는 다소 낮은 활성을 나타냈다.

최적 온도

Fibrin plate 방법을 이용하여 온도 변화에 따른 효소의 활성도 변화를 측정한 결과 Fig. 6와 같이 55°C에서 최대 활성을 보였으며 60°C 이상에서 활성이 현저히 감소하였다. 이 결과는 뽕나무버섯(Kim and Kim, 1999), 할미송이버섯(Kim and Kim, 2001)의 최적 온도와 같았으나 최적온도가 65°C인 쓴송이버섯(Kim, 2002) 보다는 낮은 온

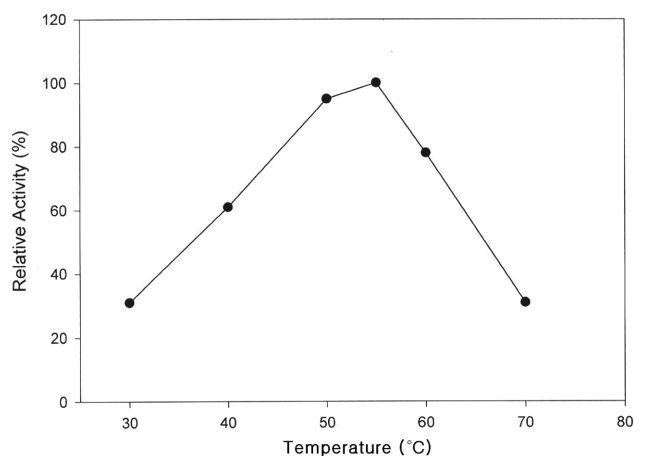


Fig. 6. Effect of temperature on the fibrinolytic activity of purified enzyme from *Lepista nuda*. The purified enzymes was incubated at temperatures from 30°C to 80°C for 3 hrs. Maximum activity was expressed as 100%.

Table 2. Effects of various divalent ions and protease inhibitor on protease activity

Reagent	Concentration (mM)	Residual activity (%)
None	1	100
Ca ²⁺	1	87
Co ²⁺	1	102
Zn ²⁺	1	83
Cu ²⁺	1	76
Mg ²⁺	1	89
Fe ²⁺	1	67
Hg ²⁺	1	0
PMSF ^a	1	0
Pepstain A	0.2	102
E-64 ^b	1	100
1,10-phenanthroline	1	98
EDTA	1	69

^aPMSF : phenylmethylsulfonyl fluoride.^bE-64 : trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)-butane.

도이다.

효소활성에 미치는 금속 2가 이온과 단백질 분해효소 저해제의 영향

분리 정제한 효소에 Ca²⁺, Zn²⁺, Mg²⁺의 용액을 첨가한 경우 효소의 혈전용해 활성이 약간 감소하였고, Cu²⁺과 Fe²⁺의 첨가 경우에는 효소활성이 급격히 감소하다가 Hg²⁺의 경우는 활성이 나타나지 않았다(Table 2). EDTA에 의해 약간 활성이 감소해 했으나 1,10-phenanthroline의 영향은 받지 않았다. 단백질분해효소 저해제에 대한 영향을 조사한 결과 cysteine protease 저해제인 E-64와 aspartic protease 저해제인 pepstain에 의해서는 거의 효소활성이 영향을 받지 않았으나 serine protease 저해제인 PMSF를 첨가한 경우에는 효소의 활성이 전혀 나타나지 않았다. 결과로부터 이 효소는 serine protease로 추정된다. 지금까지 발표된 잎새버섯(Nonaka *et al.*, 1997), 느타리버섯, 표고버섯, 팽이버섯(Shin and Choi, 1998), 뽕나무버섯, 할미송이버섯, 쓴송이버섯이 함유하고 있는 혈전용해효소들은 금속이온을 함유하는 금속 단백질 분해효소였으나 민자주방망이버섯의 경우는 지렁이와 발효식품인 새우젓과 Shiokara가 함유한 혈전 용해효소와 같은 serine protease였다.

최근 심근경색이나 뇌졸중으로 대표되는 심혈관계 질환에 의한 사망률이 제 1순위로 대두되면서 이들 질환의 가장 큰 원인이 되는 혈전과 이 혈전을 용해하는 혈전용해제에 대한 관심이 커지고 있다. 기존에 사용되고 있는 혈전용해제들은 혈전에 대한 선택성이 낮은 점 등 많은 단점을 갖고 있어 이를 개선할 수 있는 새로운 혈전용해제의 개발이 시도되고 있다. 오래전부터 식용과 약용으로 이용되고 있는 버섯은 다양한 종류의 생리활성 물질과 함께 혈전용해효소를 함유하고 있는 것으로 알려져 새로운 혈전용해제 개발을 위한 소재로 이용될 수 있다. 이와 같

이 혈전용해물질을 함유한 버섯을 식품으로 사용하여 항시 섭취 할 경우 혈전치료 효과와 더불어 예방 효과도 클 것으로 기대된다. 이와 같은 조건을 갖고 있는 것이 민자주방망이버섯이다. 이 버섯은 맛과 향이 뛰어나 식용으로도 널리 이용되고 있으며 항암 효과도 큰 것으로 알려져 있다. 또한 실험을 통해 활성이 높은 혈전용해효소도 함유 하고 있는 것으로 밝혀졌다. 분리한 이 효소의 비활성은 할미송이버섯으로부터 분리한 효소 보다는 적지만, 뽕나무 버섯이나 쓴송이버섯으로부터 분리한 효소 보다 크고, 젓갈, 청국장으로부터 분리한 효소들 보다는 매우 큰 것을 알 수 있었다. 다른 버섯의 경우와 비교하면 할미송이 버섯은 활성이 매우 크지만 약간의 독성을 갖고 있고 뽕나무 버섯의 경우 식용 가능하지만 야생에서 대량 재배 시에는 버섯 균사가 사물 기생과 더불어 활물 기생도 하므로 다른 나무에 피해를 줄 수도 있다. 혈전용해 활성이 큰 민자주방망이버섯은 식용 가능하여 식품으로 이용할 수 있을뿐더러 새로운 혈전 용해제의 재료로 사용할 수도 있다. 따라서 대량 재배가 가능할 경우 식용 뿐 아니라 약용으로의 사용가능성도 커 소비가 증대 할 것으로 기대된다.

적 요

민자주방망이버섯으로부터 분리한 혈전용해효소의 비활성은 22.78 U/mg이었으며, fibrin를 직접 용해하는 fibrinolytic enzyme이었다. 15번째까지 N-terminal amino acid 서열 분석 결과, Tyr-Pro-Ser-Pro-Ser-His-Gln-Thr-Ala-Val-Asn-Ala-Ile-Ile-X로 지금까지 발표되지 않은 새로운 효소였다. 분자량은 34 KDa이고 pH 7.0부터 pH 9.5의 넓은 영역에서 높은 활성을 나타내는 alkaline protease였으며, 55°C에서 가장 큰 활성을 보이는 이 효소는 serine protease 저해제인 phenylmethylsulfonyl fluoride를 첨가한 경우 효소의 활성이 전혀 나타나지 않는 것으로 미루어 높은 혈전용해 활성을 갖는 새로운 serine protease로 생각된다. 또한 Hg²⁺의 금속이온을 첨가한 경우에도 효소의 활성은 완전히 사라졌다.

감사의 글

본 연구는 2004년도 상지대학교 교내연구비의 지원으로 이루어졌음을 밝히며 감사드립니다.

참고문헌

- 김길영. 1998. 임상지혈혈전학. 군자출판사. 33pp.
- 김병각, 김진숙, 최웅철, 김혜령, 이종길, 이정옥, 정경수, 심미자. 1983. 한국산 고등 균류의 성분 연구(제 37보). 한국균학회지 11: 151-157.
- 김승호. 1998. 된장의 기능성에 대한 새로운 연구방향-혈전용해능에 관하여. 한국콩연구회지 15: 8-15.

- 김준호, 이호용, 유관희, 김양선, 석순자, 김양섭. 1998. 치악산 버섯추출물로부터 Fibrin 분해활성의 검색. *한국균학회지* **26**: 589-593.
- 박상신, 이갑득, 민태진. 1995. 버섯 중 항균물질의 검색 및 개발에 관한 연구. *한국균학회지* **23**(1): 28-36.
- 안덕균. 1992. 한국산 약용 균류. *한국균학회지* **20**: 154-166.
- Daka, M. D. and Semba, C. P. 1995. Thrombolytic therapy in venous occlusive disease. *J Vasc Interv Radiol*, **6**:(suppl) 73-77.
- 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, 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. of Fermentation and Bioengineering.* **84**(4): 307-312.
- Kim, J. H. 2002. The Screening test of wild mushroom extracts for fibrinolytic activity. *Kor. J. Biomed. Lab. Sci.* **8**(3): 173-177.
- _____. 2002. Purification and characterization of fibrinolytic enzymes from *Tricholoma sejunctum*. *Kor. J. Biomed. Lab. Sci.* **8**(3): 173-177.
- _____ 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.
- _____ and _____. 2001. Characterization of a metalloenzyme from a wild mushroom, *Tricholoma saponaceum*, *Biosci. Biotech. Biochem.* **65**(2): 356-362.
- 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, 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. pp. 5-17.