

Fomitella fraxinea 균사체로부터 Fibrin 분해효소의 최적생산 및 효소적 특성

이종석 · 백형석 · 박상신^{1*}

부산대학교 자연과학대학 미생물학과, ¹동국대학교 자연과학대학 생명공학과

Optimal Production and Characterization of Fibrinolytic Enzyme from *Fomitella fraxinea* Mycelia. Lee, Jong-Seok, Hyung-Suk Baik, and Sang-Shin Park^{1*}. Department of Microbiology, Pusan Nat'l Univ. Busan 609-735, Korea, ¹Department of Biotechnology, Dongguk Univ. Gyeongju 780-714, Korea – The culture condition was investigated to maximize the production of fibrinolytic enzyme from *Fomitella fraxinea* mycelia. Among the tested media, *Coriolus versicolor* medium (CVM) showed the highest production for the enzyme. 2% galactose, 0.6% yeast extract and 0.1% NaNO₃, 0.1% K₂HPO₄, and 0.05% MgSO₄·7H₂O as carbon, nitrogen, phosphorus, and inorganic salt sources resulted in the maximum level of the enzyme activity, respectively. The enzyme production from *F. fraxinea* was reached to highest level after the cultivation for 10 days at 25°C and pH 9. The enzyme activity of culture supernatant was most active at 40°C and pH 10. The activity of the enzyme was inhibited by phenylmethylsulfonylfluoride and aprotinin, suggesting that it is a serine protease.

Key words: *Fomitella fraxinea*, fibrinolytic enzyme, optimal production

혈전은 손상된 혈관 주변에서 혈장 중의 fibrinogen이 prothrombin으로부터 활성화된 thrombin(EC 3.4.21.5)의 작용에 의하여 fibrin으로 전환되어 불용성 중합체를 형성함으로써 생성된다[18]. 한편, 체내에 형성된 혈전의 용해는 plasminogen으로부터 plasminogen activator에 의하여 활성화된 plasmin(EC 3.4.21.7)의 작용에 의하여 용해된다[20]. 혈전을 구성하는 fibrin의 형성과 용해는 생체 내에서 일련의 효소반응에 의하여 매우 정교하게 조절되고 있다[6]. 그러나, fibrin이 체내의 조절 계에 의하여 정상적으로 가수분해되지 않고 혈관에 축적될 때 뇌혈관질환, 심근경색 및 심장마비 등이 초래된다[5]. 이에 따라 최근 혈전에 의한 성인병의 치료제를 개발하기 위하여 혈전의 형성을 예방하는 항혈전제 및 생성된 혈전의 용해제를 개발하기 위한 연구가 국내외에서 활발히 진행되고 있다.

지금까지 많이 사용되고 있는 혈전 용해제로서는 urokinase [32], streptokinase[19,26], lumbrokinase[21], 및 tissue-type plasminogen activator(tPA)[28] 등이 있으며, 이 외에도 최근에 식품 중에서 연구된 혈전용해효소로서 일본의 전통발효식품 중의 serine protease 유형의 nattokinase[4]와 국내의 콩 발효식품 중의 혈전용해효소[11,15,16,31] 등이 연구됨으로써 건강 증진을 위한 기능성 식품의 가치에 대한 관심이

점차 증가되고 있다.

버섯은 국내외에서 식품 및 의약품으로 널리 애용되고 있는 가운데 지금까지 많은 연구에 의하여 다양한 종류의 버섯 자실체로부터 항암, 면역증강 활성, 혈압 상승 억제 및 항균물질 등의 생리활성 물질이 보고되어 왔으며[12,14,30], 또한 protease를 포함한 다양한 종류의 효소에 대한 연구가 진행되어 왔다[22,23,25]. 특히 최근에는 상황버섯 균사체 추출물로부터 혈액 항응고 활성이 보고 되어 있으며[10], 뽕나무 버섯 자실체와 느타리버섯 자실체로부터 혈전용해효소의 특성이 연구되었다[3,9]. 이들 버섯 중의 혈전용해효소는 아연을 함유하는 금속효소이며, serine protease라는 유형이 아닌 것으로 밝혀져 지금까지 알려진 혈전용해효소와는 다른 특성을 나타내었다.

아카시 재목버섯(*Fomitella fraxinea*)은 민주름 버섯목 구멍장이 버섯과에 속하는 담자균류로서 장수버섯이라고도 명명되며 오래 전부터 민간 약재로 사용되어 왔다[17]. 본 연구진은 *F. fraxinea* 자실체로부터 steroid 계통의 항산화 화합물[24]을 분리정제하여 구조를 분석하여 보고한 바 있으며, 이 외에 면역활성 다당체[2] 및 DNA polymerase 저해제[29] 등의 생리활성 물질이 연구 보고됨으로써 그 약리적 효능이 입증된 바 있다.

본 연구에서는 다양한 생리활성 물질을 함유하는 버섯류의 액체 배양방법을 이용하여 우수한 혈전용해 활성을 얻기 위한 목적으로 *F. fraxinea* 균사체로부터 혈전용해 효소를 생산하기 위한 최적 배양조건을 조사하였으며, 효소의 특성을 관찰하였다.

*Corresponding author

Tel: 82-54-770-2225, Fax: 82-54-770-2210

E-mail: sspark@dongguk.ac.kr

재료 및 방법

사용 균주

본 실험에서 사용한 아카시재목 버섯의 균주는 농촌진흥청에서 분양 받은 ASI-17015 균주로서, 보관용 배지로는 PDA(potato dextrose agar) 배지를 사용하여 사면배지 상에서 25°C, 7일 동안 배양한 후 4°C 냉장고에 보관하였다.

시험배지 및 균사배양

*F. fraxinea*로부터의 혈전용해 효소의 생산성을 비교하기 위한 배지로는 CVM(*Coriolus versicolor* meduim), CDM (Czapek Dox medium), LEM(*Lentinus edodes* medium), MCM(Mushroom complete medium), MYGM(Malt yeast glucose medium), 및 PDM(potato dextrose medium)을 사용하였으며 각 배지의 조성은 Table 1과 같다. *F. fraxinea*를 PDA 평판 배지 상에 접종하여 25°C에서 7일 동안 배양한 후 한천 배지 상의 균사를 5 mm cork borer로 절단하여 균사 disk 5개씩을 균일하게 각각의 액체배지 100 ml에 접종하여 25°C에서 10일간 120 rpm으로 진탕 배양하였다. 사용한 모든 배지는 121°C에서 15분 동안 멸균하였다. 탄소원, 질소원, 인산원 및 무기이온 등의 영양원에 따른 효소 생산성을 관찰하기 위하여 시험배지 중 가장 높은 효소 활성을 나타내는 CVM의 조성 중 해당 영양원을 제거하고 2% 탄소원, 0.1% 질소원과 인산원 및 0.05% 무기이온 들을 각각 첨가하여 실험하였다. 효소 생산을 위한 최적 배양온도를 측정하기 위하여 15°C~40°C까지 항온기의 온도를 5°C 간격으로 조절하여 배양하였으며, 최적 pH를 측정하기 위하여 액체배지의 pH를 0.1 N HCl과 NaOH로 pH 4~10까지 조절한 후 최적 배양온도에서 최적 배양시간 동안 배양하였다.

혈전용해효소 활성 측정

Table 1. Composition of various media.

Component	Media (g/100ml)					
	CVM	CDM	LEM	MCM	MYGM	PDM
Dextrose	2.0		2.0	2.0	0.4	2.0
Sucrose		3.0				
Starch			2.0			
Galactose						
Peptone	0.4			0.2		
Malt extract					1.0	
Yeast extract	0.6		0.6	0.2	0.4	
Potato						20.0
NaNO ₃		0.3				
KH ₂ PO ₄	0.046		0.046	0.05		
K ₂ HPO ₄	0.1	0.1	0.1			
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05	0.05	0.05	0.05		
KCl		0.05				
FeSO ₄ ·7H ₂ O		0.001				

F. fraxinea 배양액을 3000×g 에서 15분 동안 원심분리한 후 상등액을 조효소액으로 사용하였으며, 효소 활성은 fibrin plate 상에서 Astrup 방법[1]을 변형하여 측정하였다. 0.1 M 인산 완충용액(pH 7.4)으로 조제한 1.0% human fibrinogen 2.5 ml에 1% agarose 수용액 7.4 ml와 thrombin(100 NIH unit/ml) 0.1 ml를 가하여 petridish 상에서 응고시켰다. 형성된 fibrin plate 상에 직경 1 mm의 구멍을 내어 조효소액 5 µl 를 점적하여 37°C에서 8시간 동안 반응시킨 후 용해되는 환의 크기를 측정하였다.

최적 pH와 최적 온도

균사체로부터 생산된 효소의 활성에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위하여 50 mM 초산 완충용액(pH 4.0~6.0), Tris-HCl 완충용액(pH 7.0~9.0), carbonate-bicarbonate 완충용액(pH 10.0~11.0)를 사용하였으며, 기질로 0.5 mM succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA를 사용하였다. 조효소액 100 µl에 기질 500 µl를 가한 후 각각의 pH별 완충용액으로 최종 부피 1 ml로 조절한 후 405 nm에서 3분 동안 흡광도 변화를 측정하였다. 최적온도를 조사하기 위하여 fibrin plate 상에서 조효소액의 반응온도를 20°C에서 70°C까지 10°C 간격으로 변화시키며 활성도를 측정하였다.

효소활성에 미치는 저해제의 영향

효소의 활성에 대한 저해제의 영향을 관찰하기 위하여 조효소액과 각각의 저해제를 섞어서 37°C에서 1시간 동안 방치한 후 기질과 반응시켜 405 nm에서 3분 동안 흡광도 변화를 측정하였다.

결과 및 고찰

배지의 영향

*F. fraxinea*로부터 혈전용해효소를 생산하기 위한 최적 배지 조건을 확립하기 위하여 종류별 배지를 사용하여 배양한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 배지 중 CVM을 사용하여 배양하였을 때 fibrin plate 상에서 용해되는 환의 크기가 11 mm로 다른 배지들에 비하여 혈전용해 효소의 생산능력이 우수함을 알 수 있었다.

탄소원의 영향

효소의 생산을 위한 탄소원의 효과를 조사하기 위하여 CVM에 2%의 각 종류별 탄소원을 첨가하여 배양한 결과, galactose가 탄소원으로 첨가되었을 때 효소의 활성이 가장 우수하였다(Table 2). 또한 starch, cellulose 및 glycerol등의 탄소원이 첨가되었을 때 CVM의 기본탄소원인 glucose에 비하여 효소의 생산성이 우수하였으나, cellobiose, xylose, 및 maltose 등은 효소의 생산능력이 상대적으로 감소하였다. 이 결과는 이 등[13, 15]의 박테리아 균주로부터 혈전용해효소

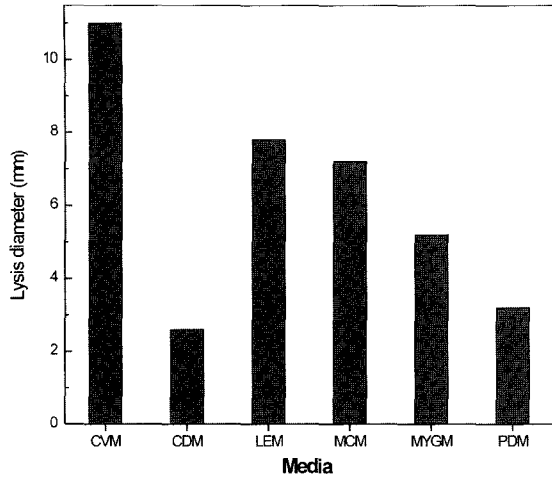


Fig. 1. Fibrinolytic activity of *F. fraxinea* cultivated by the various media. Cultivation was carried out at 25°C for 10 days. The fibrinolytic activity was assayed with culture extract.

Table 2. Effect of carbon sources on the fibrinolytic enzyme production of *F. fraxinea*.

Carbon source (2%)	Lysis diameter (mm)
CVM ^a	11.0
Control ^b	7.2
Cellobiose	9.2
Sucrose	11.0
Starch	12.8
Mannose	11.0
Galactose	15.0
Cellulose	11.8
Xylose	9.2
Maltose	9.2
Fructose	11.0
Lactose	11.0
Glycerol	11.8
Mannitol	0.0

Lysis diameter was measured after 10 days of incubation at 25°C. ^a*Coriolus versicolor* medium. ^bThe CVM without carbon source.

를 생산하기 위한 탄소원 중 starch가 우수한 효소생산능력을 나타내는 것과는 유사하였으나, cellobiose가 효소의 생산능력을 감소시키는 것과는 상이하였다.

질소원의 영향

효소의 생산을 위한 질소원의 효과를 조사하기 위하여 CVM에 0.1%의 각 종류별 질소원을 첨가하여 배양한 결과는 Table 3에 나타내었다. 유기질소원 중 yeast extract가 우수한 효소생산능력을 나타내었으나, 전체 질소원 중 NaNO₃가 가장 높은 효소활성을 나타내었다. 특히 0.1% NaNO₃와 yeast extract를 농도별로 혼합 첨가하였을 때 효소의 활성이

Table 3. Effect of nitrogen sources on the fibrinolytic enzyme production of *F. fraxinea*.

Nitrogen source (0.1%)	Lysis diameter (mm)
CVM ^a	11.0
Control ^b	0.0
NaNO ₃	12.0
Ammonium tartrate	6.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	6.0
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.0
NH ₄ NO ₃	5.0
NH ₄ Cl	0.0
Peptone	0.0
Malt extract	0.0
Tryptone	0.0
Yeast extract	7.0

Lysis diameter was measured after 10 days of incubation at 25°C. ^a*Coriolus versicolor* medium. ^bThe CVM without nitrogen source.

Table 4. Effect of yeast extract and sodium nitrate as nitrogen sources on the fibrinolytic enzyme production of *F. fraxinea*.

Component	Lysis diameter (mm)
CVM ^a	11.0
Control ^b	0.0
NaNO ₃ 0.1%+Yeast extract 0.1%	12.2
NaNO ₃ 0.1%+Yeast extract 0.3%	12.6
NaNO ₃ 0.1%+Yeast extract 0.6%	13.2

Lysis diameter was measured after 10 days of incubation at 25°C. ^a*Coriolus versicolor* medium. ^bThe CVM without nitrogen source.

더 증가함을 알 수 있었다(Table 4). 그밖에 malt extract 또는 peptone 등의 질소원을 첨가하였을 때 효소활성은 거의 없었다. 이는 Kalebina 등[8]이 *Bacillus brevis*로부터 혈전용해효소를 생산하기 위한 질소원 중 yeast extract가 우수하다고 보고한 결과와 일치하였으나, *B. subtilis* KCK-7로부터 효소가 peptone에 의하여 크게 활성화된다는 Lee 등[15]의 결과와는 상이하였다.

인산원 및 무기질원의 영향

효소의 생산을 위한 인산원과 무기질원의 효과를 조사하기 위하여 CVM에 0.1%의 각 종류별 인산원 및 무기질원을 첨가하여 배양한 결과는 Table 5에 나타내었다. 인산원 중 K₂HPO₄의 첨가가 효소의 생산성을 크게 증가시켰으며, 무기질원의 경우 CVM의 구성성분인 MgSO₄ · 7H₂O가 효소의 생산을 가장 증가시켰다. 그러나, CaCl₂, CuSO₄ · 5H₂O, KCl은 효소의 활성을 나타내지 않았다. 이와 같은 결과는 *B. subtilis*로부터 혈전용해효소를 생산하기 위하여 K₂HPO₄와 Na₂HPO₄가 우수한 반면 CuSO₄ · 5H₂O 등은 효소의 활성을 크게 억제한다고 보고한 Lee 등[15]의 결과와 일치하였다.

배양시간에 따른 효소의 생산

이상의 실험결과로부터 *F. fraxinea* 균사체 중의 혈전용해 효소를 생산하기 위하여 최적화된 배지, 2% galactose, 0.6% yeast extract, 0.1% NaNO₃, 0.1% K₂HPO₄ 0.05% MgSO₄ · 7H₂O를 포함하는 배지를 이용하여 *F. fraxinea* 균사체를 시간별로 배양한 결과는 Fig. 2와 같다. 10일 동안 배양하였을 때 효소의 활성이 가장 높았으며, 그 이후에는 점차 감소하

Table 5. Effect of phosphorus sources and inorganic salts on the fibrinolytic enzyme production of *F. fraxinea*.

Phosphorus source (0.1%)	Lysis diameter (mm)
CVM ^a	11.0
Control ^b	8.8
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	8.8
Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	10.5
KH ₂ PO ₄	8.4
K ₂ HPO ₄	11.0
(NH ₄) ₂ HPO ₄	10.0
Inorganic salts (0.05%)	
CVM ^a	11.0
Control ^c	0.0
NaCl	6.6
MgSO ₄ · 7H ₂ O	11.0
CaCl ₂	0.0
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.0
KCl	0.0

Lysis diameter was measured after 10 days of incubation at 25°C.

^a*Corioliolus versicolor* medium.

^bThe CVM without phosphorus source.

^cThe CVM without inorganic salts.

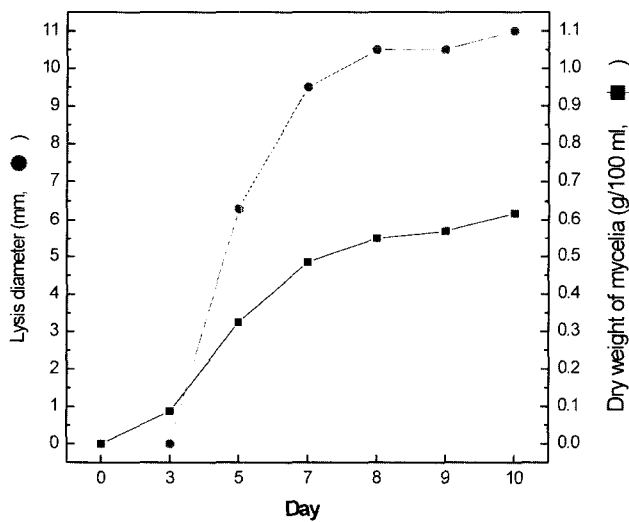


Fig. 2. Time course of the fibrinolytic enzyme production from *F. fraxinea*. Cultivation was carried out at 25°C for 20 days in the CVM. The fibrinolytic activity was assayed with the culture extract.

였다. 지금까지 보고된 바에 따르면, 배양시간이 적은 미생물인 *B. subtilis*로부터의 혈전용해효소[15]는 48시간 배양 후 효소의 활성이 최대를 나타내었으며 *Pseudomonas* sp. [27] 중의 효소는 96시간 배양 후 최대의 효소활성을 보인 것으로 보아 균류에 속하는 *F. fraxinea* 균사체로부터 혈전용해효소를 생산하기 위한 배양시간은 비교적 길었다. 그러나 버섯 균사체로부터 대부분의 효소활성을 얻기 위한 배양기간은 일반적으로 7일 내지 14일 정도의 시간이 소요되는 것으로 보아[3,7], 본 효소의 생산을 위한 배양기간 역시 이 범주에 속하는 것으로 사료된다.

배양온도 및 pH의 영향

최적 배양기간인 10일 동안 배양할 때 효소의 생산을 위한 배양온도와 배지의 초기 pH의 영향을 Fig. 3 및 4에 나타내었다. *F. fraxinea* 균사체를 25°C, 초기 pH 9.0에서 10일 동안 배양하였을 때 효소의 활성이 가장 증가함을 알 수 있었다.

효소 활성의 최적 pH와 최적 온도

균사체 배양액 중의 효소활성을 위한 온도 및 pH의 영향은 Fig. 5 및 6과 같다. 효소의 활성은 pH 6.0부터 급격히 증가하다가 pH 10.0에서 최고의 활성을 나타내었으며, 40°C에서 각각 최고의 활성도를 나타내었다. 이 결과는 Yoo 등 [31]이 보고한 *B. subtilis* K-54로부터 분리한 혈전용해효소의 최적 pH 10과 일치하였으나, Kim 등[9]이 보고한 뽕나무 버섯으로부터 분리 정제한 효소의 최적 pH 7.0 및 Choi 등[3]이 보고한 느타리버섯 중의 효소의 최적 pH 7.5와는 상이함을 알 수 있었다. 한편, 뽕나무 버섯에서 분리정제한 효

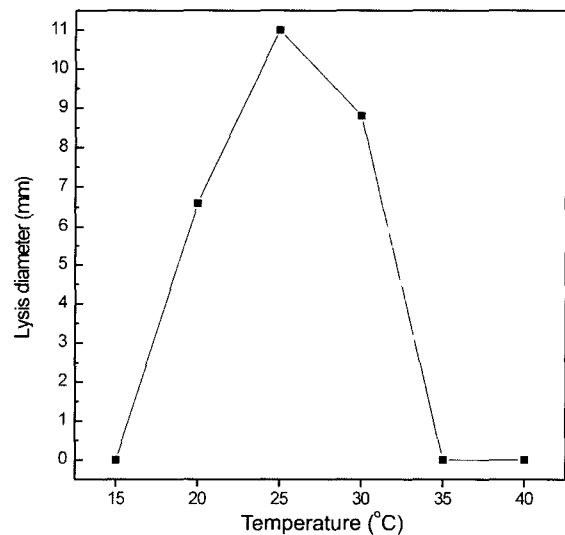


Fig. 3. Effect of temperature on the fibrinolytic enzyme production from *F. fraxinea*. Cultivation was carried out for 10 days in the CVM. The fibrinolytic activity was assayed with the culture extract.

소의 최적 온도 45°C와는 유사하였으나, *Bacillus subtilis* K-54[31] 및 *Bacillus* sp. 균주 CK11-4[11] 중의 효소의 경우 65°C 및 70°C에서 각각 최고의 활성을 보임으로써 본 효소의 특성과 상이함을 나타내었다.

저해제의 영향

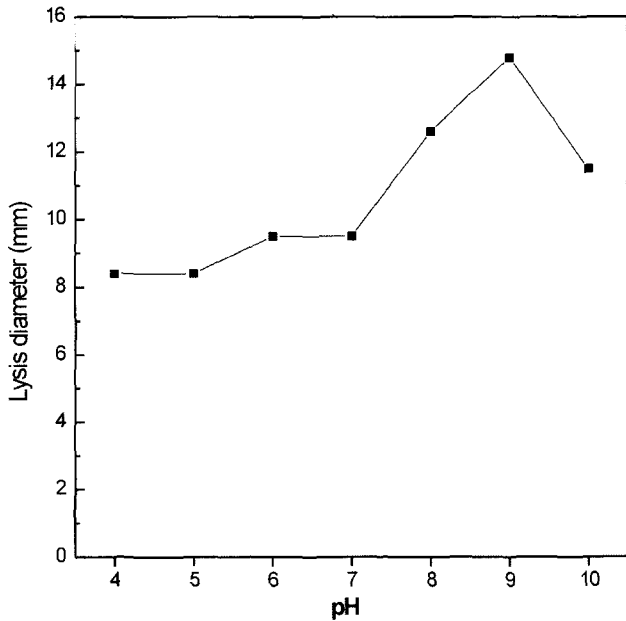


Fig. 4. Effect on initial pH on the fibrinolytic enzyme production from *F. fraxinea*. Cultivation was carried out at 25°C for 10 days in the CVM. The fibrinolytic activity was assayed with the culture extract.

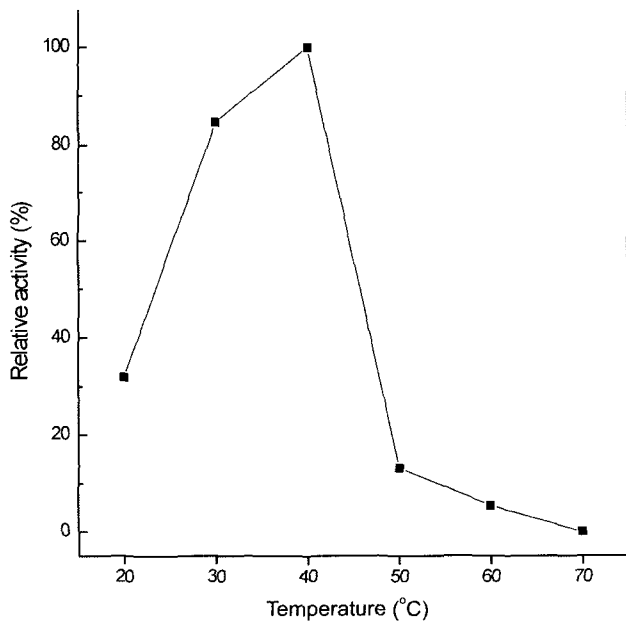


Fig. 5. Effect of temperature on the activity of the fibrinolytic enzyme from *F. fraxinea*.

화학적 저해제가 효소의 활성에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 6과 같다. 효소의 활성은 cysteine protease의 저해제인 TLCK 및 aspartic protease 저해제인 pepstatin A에 의하여 거의 억제되지 않았으나, serine protease로 알려져 있는 PMSF 및 aprotinin에 의하여 거의 완전히 억제되는 것으로 보아 이 효소가 serine protease 계열의 효소임을 알 수 있었다. 한편, 이 효소의 활성이 EDTA 나 EGTA 등에 의하

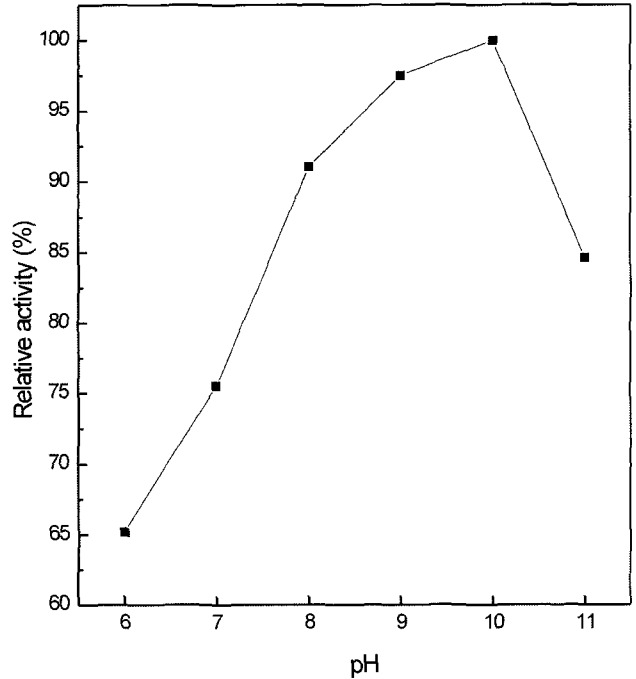


Fig. 6. Effect of pH on the activity of the fibrinolytic enzyme from *F. fraxinea*.

Table 6. Effect of some inhibitors on the proteolytic activity of *F. fraxinea*.

Inhibitor	Concentration (mM)	Relative activity (%)
None	—	100
EDTA ^a	5	97
	10	97
EGTA ^b	5	105
	10	111
PMSF ^c	1	0
TLCK ^d	1	104
E-64 ^e	1	70
Aprotinin	0.05	0
Pepstatin A	0.2	78

The results were expressed as percent (%) relative activity to that of none.

^aethylenediamine tetraacetic acid.

^bethyleneglycol tetraacetic acid.

^cphenylmethylsulfonyl fluoride.

^dN α -p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone.

^eN-(trans-epoxysuccinyl)-L-leucine-4-guanidinbutylamide.

여 크게 영향을 받지 않는 것으로 보아 금속효소가 아님을 알 수 있었다. 지금까지 보고된 바에 따르면, nattokinase 및 청국장으로부터 분리한 *Bacillus* sp. 균주 CK11-4 중의 혈전용해효소 등은 serine protease이며 대부분의 효소가 아연을 포함하는 금속효소[11]임이 밝혀져 있다. 한편, 팥나무 버섯 중의 혈전용해효소[9] 및 느타리버섯 중의 효소[3]는 serine protease 계열이 아니며, 아연을 포함하는 금속 효소류에 속하는 것으로 보고되어 있어서 본 효소의 특성이 다른 담자균류의 혈전용해효소와 상이하다는 것을 추정할 수 있었다.

요 약

아카시재목 버섯 균사체로부터 혈전용해효소를 생산하기 위한 최적 배양조건을 조사하였다. 복합배지 중 CVM이 가장 우수하였으며, 탄소원, 질소원, 인산원 및 무기질원으로 각각 2% galactose, 0.6% yeast extract와 0.1% NaNO₃, 0.1% K₂HPO₄, 및 0.05% MgSO₄ · 7H₂O의 첨가에 의하여 효소의 활성이 가장 증가하였다. 따라서 *F. fraxinea*로부터 혈전용해효소를 생산하기 위한 최적 배지조건은 2% galactose, 0.6% yeast extract, 0.1% NaNO₃, 0.1% K₂HPO₄ 및 0.05% MgSO₄ · 7H₂O이다. 이상의 배지를 사용하여 배양온도 25°C 초기 pH 9에서 10일 동안 배양하였을 때 효소의 생산이 가장 높은 결과를 나타내었다. 배양액 중의 효소의 최적 온도 및 pH는 40°C 및 pH 10이었다. 본 효소의 활성이 PMSF와 aprotinin에 의하여 완전히 억제되는 것으로 보아 본 효소가 serine protease 계열의 효소임을 추정할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 2002년도 동국대학교 논문게재연구비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Astrup, T. and S. Mullertz. 1952. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch. Biochem. Biophys.* **40**: 346-351.
- Cho, S. M., J. H. Lee, S. B. Han, H. M. Kim, S. H. Yu, and I. D. Yoo. 1995. Immunostimulating polysaccharides from the fruiting Bodies of *Fomitella fraxinea*(I)-characterization of polysaccharides extracted with neutral sodium chloride solution. *Kor. J. Mycol.* **23**: 332-339.
- Choi, H. S. and H. H. Shin. 1998. Purification and partial characterization of a fibrinolytic protease in *Pleurotus ostreatus*. *Mycologia* **90**: 674-679.
- Fujita, M., K. Nomura, K. Hong, Y. Ito, A. Asada, and S. Nishimuro. 1993. Purification and characterization of strong fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto, a popular soybean fermented food in Japan. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **197**: 1340-1347.
- Gomez, C. C., R. Simoncarballo, A. C. Coma, T. Sanchez de Leon, D. E. Montero, and P. R. Rodriguez. 1991. The relationship between lipid peroxidation and platelets aggregation in atherosclerotic patients. *Angiologia* **43**: 241-246.
- Harlan, J. M. and L. A. Harker. 1981. Haemostasis, thrombosis and thromboembolic disorder. *Med. Clin. North Am.* **65**: 855-857.
- Heinzkill M, L. Bech, T. Halkier, P. Schneider, and T. Anke. 1998. Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi (family *Coprinaceae*). *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1601-1606.
- Kalebina, T. S., N. R. Galina, I. O. Seyakh, O. M. Khodova, and I. S. Kulaev. 1988. Serine proteinase from *Bacillus brevis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 531-533.
- Kim J. H. and Y. S. Kim. 1999. A Fibrinolytic metalloprotease from the fruiting bodies of an edible mushroom, *Armillariella mellea*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**: 2130-2136.
- Kim, J. S. 1998. Blood Anticoagulant activity of Extracts from the Mycelia of *Phellinus linteus*. *Master thesis*, Korea University.
- Kim, W. K., K. H. Choi, Y. T. Kim, H. H. Park, J. Y. Choi, Y. S. Lee, H. I. Oh, I. B. Kwon, and S. Y. Lee. 1996. Purification and Characterization of a Fibrinolytic Enzyme Produced from *Bacillus* sp. Strain CK11-4 Screened from Chungkook-Jang. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2482-2488.
- Kweon, M.H., H. Jang, W. J. Lim, H.I. Chang, C.W. Kim, H.C. Yang, H.J. Hwang, and H.C. Sung. 1999. Anticomplementary properties of polysaccharides isolated from fruit bodies of mushroom *Pleurotus ostreatus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **9**: 450-456.
- Lee, E. G., E. H. Park, H. H. Lee, and H. H. Hyun. 1996. Isolation and Characterization of *Pseudomonas* sp. producing alkaline protease. *Kor. J. Microbiol.* **22**: 289-297.
- Lee, J. H., S. M. Cho, H. M. Kim, N. D. Hong, and I. D. Yoo. 1997. Immunostimulating activity of polysaccharides from mycelia of *Phellinus linteus* grown under different culture conditions. *J. Microbiol. Biotechnol.* **7**: 52-55.
- Lee, S. K., S. Heo, D. H. Bae, and K. H. Choi. 1998. Medium optimization for fibrinolytic enzyme by *Bacillus subtilis* KCK-7 isolated from Korean traditional Chungkookjang. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 226-231.
- Lee, S. K., D. H. Bae, T. J. Kwon, S. B. Lee, H. H. Lee, J. H. Park, S. Heo, and M. G. Jhonson. 2001. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. KDO-13 isolated from soybean paste. *J. Microbiol. Biotechnol.* **11**: 845-852.
- Lee, T. S. 1990. The full list of recorded mushrooms in Korea. *Kor. J. Mycol.* **18**: 233-259.
- Marks, D., A. Marks, and C. Smith. 1996. Basic Medical Biochemistry, P.107. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Madved, L. V., D. A. Solovjov, and K.C. Ingham. 1996. Domain structure, stability and interactions in streptokinase. *Eur. J. Biochem.* **239**: 333-339.

20. Mullertz, S. 1987. Fibrinolysis, general aspects, characteristic features and perspectives, Int'l Committee for fibrinolysis-kabi Prize Lecture. *Fibrinolysis* **1**: 3-12.
21. Nakajima, N., H. Mihara, and H. Sumi. 1993. Characterization of potent fibrinolytic enzymes in earthworm. *Lumbricus rebellus*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**: 1730-1737.
22. Nonaka, T., H. Ishikawa, Y. Tsumuraya, Y. Hashimoto, and N. Dohmae. 1995. Characterization of a thermostable lysine-specific metallopeptidase from the fruiting bodies of a basidiomycete, *Grifola frondosa*. *J. Biochem.* **118**: 1014-1020.
23. Park, S. S. and S. M. Hwang. 1999. Purification and characterization of a iron-containing superoxide dismutase from *Lentinus edodes*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **9**: 854-860.
24. Park, S. S., J. S. Lee, K. G. Bae, K. H. Yu, H. C. Han, and T. J. Min. 2001. Antioxidative activity and structural analysis of the steroid compound from *Fomitella fraxinea*. *Kor. J. Mycol.* **29**: 67-71.
25. Perry, C. R., M. Smith, C. H. Britnell, D. A. Wood, and C. F. Thurston. 1993. Identification of two laccase genes in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 1209-1218.
26. Reed, G. L., L. F. Parhami-Seren, and P. Kussie. 1995. Identification of plasminogen binding region in streptokinase that is necessary for the creation of functional streptokinase-plasminogen activator complex. *Biochemistry* **34**: 10266-10271.
27. Schinner, F. and R. Maregensin. 1992, Production and properties of an extracellular metalloprotease from a psychophilic *Pseudomonas fluorescens*. *J. Biotech.* **24**: 207-210.
28. Sherry, S. 1987. Recombinant tissue plasminogen activator. *Am. J. Cardiol.* **59**: 984-989.
29. Tanaka, N., A. Kitamura, Y. Mizushima, F. Sugawara, and K. Sakaguchi. 1998. Fomitelic acid, triterpenoid inhibitors of eukaryotic DNA polymerases from a Basidiomycete, *Fomitella fraxinea*. *J. Nat. Prod.* **61**: 193-197.
30. Toshio, M. and N. Motohiro. 1981. Studies on fungal polysaccharides. XXVII. Structural examination of a water-soluble, antitumor polysaccharides of *Ganoderma lucidum*. *Chem. Pharm. Bull.* **29**: 3611-3616.
31. Yoo, C. K., W. S. S. Heo, C. S. Lee, and S. M. Kang. 1998. Purification and characterization of fibrinolytic enzyme excreted by *Bacillus subtilis* K-54 isolated from Chung Guk Jang. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 507-514.
32. Zaworski P. G., K. R. Marotti, V. MacKay, C. Yip, and G. S. Gill. 1989. Production and secretion of porcine urokinase in *Saccharomyces cerevisiae*: characterization of the secreted gene product. *Gene* **28**: 545-551.

(Received Agu. 14, 2002/Accepted Nov. 21, 2002)