

# Protease 생산을 위한 최적 배양조건 및 생산된 Protease의 특성\*<sup>1</sup>

조희연\*<sup>2</sup> · 조남석\*<sup>3+</sup>

## Optimization of Submerged Culture Conditions for Protease Production and Its Enzymatic Properties\*<sup>1</sup>

Hee-Yeon Cho\*<sup>2</sup> · Nam-Seok Cho\*<sup>3+</sup>

### 요 약

본 연구는 표고버섯균의 액체배양을 통한 protease효소의 최적생산 조건을 찾고, 생산된 protease의 효소적 특성을 구명하고자 실시하였다.

Protease 대량생산을 위한 공시균으로서 표고버섯균(*Lentinula edodes*)을 사용하였으며, 최적생산 조건을 구명하기 위하여 생산기질의 조성, 배양조건, 배양기간 등을 검토하였다. 배지의 조성별 protease 생산성에 있어서는 밀기울+옥수수가루+물+옥수수기름(WB+CF+W+CO)조합이 84.8 U/g으로서 가장 높은 protease 생산성을 보여주었고, 콩가루와 소맥분조합의 protease 생산성이 매우 낮은 것을 알 수 있었다. Protease 생산을 위한 배양매체로서 acetate buffer에서는 전혀 protease의 생산이 되지 않았으며, pH 6.2의 이온교환수가 80.5 U/g의 가장 높은 protease 생산성을 나타냈다. 이온교환수를 pH 4.0으로 조절하였을 때 생산성은 62.3 U/g으로 낮아졌다. 배양기간에 따른 protease 생산성은 배양시간이 경과됨에 따라 증가하였으며, 72시간 배양으로 90.6 U/g의 최대값에 달하였고, 그 이후 점차 감소하는 경향으로 나타났다. Sephadex G-75 chromatography로 측정된 생산된 protease의 분자량은 약 45,000이었다.

*Lentinula edodes*를 이용하여 생산된 protease의 효소특성을 상이한 pH 및 온도의 조건에서 조사한 결과, 최적 pH는 4에서 나타났으며, 37°C(1 시간)에서 측정된 활성은 pH 4~6 범위에 있었다. Protease의 온도안정성을 조사한 결과 최적온도는 55°C에서 나타났으며, 30~60°C의 넓은 온도범위에서 안정함을 알 수 있어서 이 효소는 소화용 제제, 식품공업, 맥주제조업 및 가죽무두질 등 널리 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

\*<sup>1</sup> 접수 2004년 3월 25일, 채택 2004년 5월 20일

\*<sup>2</sup> 미국 데이비스캘리포니아대학 분자세포생물학연구소, Section of Molecular & Cellular Biology, University of California Davis, Davis, CA 95616, USA

\*<sup>3</sup> 충북대학교 산림과학부 목재·종이과학전공, Wood and Paper Science, School of Forest Resources, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

+ 주저자(corresponding author) : 조남석(e-mail: nscho@chungbuk.ac.kr)

## ABSTRACT

This study was performed to investigate the optimum condition of protease production from submerged culture of oak mushroom (*Lentinula edodes*, Sanlim No. 5) and its enzymatic features. Among several combinations of media, the combination of wheat bran, corn flour, water and corn oil (WB+CF+W+CO) yielded 84.8 U/g of maximum protease activity. This combination of ingredients, in spite of not being particularly protein-rich in comparison to the other media, allowed for good growth of the fungus and maximal protease production. Comparison of different growth medium liquids indicated that demineralized water afforded the best growth of the fungus and the highest protease activity. Acetate buffer and acidified water negatively affected. The protease production peaked around 72 hr of incubation, and decreased thereafter. The molecular weights of produced protease were about 45,000 by Sephadex G-75 chromatography.

The pH optimum for protease activity was 4, while maximal activity incubated at 37°C for 1 hr was observed between pH 4~6. The optimum temperature of this protease was 55°C, and the enzyme was active over a broad temperature range (30~60°C), indicating that this protease would be suitable for a wide range of applications where different pH and temperature are necessary, such as digestive aids, food industry, beer and tannery industries.

**Keywords:** oak mushroom, *Lentinula edodes*, protease, submerged culture, growth medium, protease production

## 1. 서 언

버섯류의 성분에 대한 외국의 연구는 헤아릴 수 없을 정도로 많이 이루어지고 있으며, 국내에서도 식용 및 약용에 관한 많은 연구가 약학·제약분야를 비롯하여 천연물관련 연구소, 농업과학기술원 등을 중심으로 관련분야에서 부분적인 연구가 이루어지고 있고, 영지·상황·진흙버섯·동충화초 등에 대한 약용, 실용화연구가 활발히 이루어지고 있다.

버섯류는 고섬유질 식품으로 평가되고 있으며, 항암(Cho *et al.*, 1988) 및 항종양성(Sakagami, 1988; Maruyama *et al.*, 1989; Mizuno, 1995; 진 등, 1998), 혈압강하(Kabir & Kimura, 1989) 등 생리기능이 해명되면서 그 중요성이 주목받고 있다. 버섯에 포함된 생리활성 성분 가운데 구름버섯(Hirase *et al.*, 1976a; Hirase *et al.*, 1976b; Park *et al.*, 1989)으로부터의 clestine, mizofirane, 표고버섯에 들어 있는 혈중 콜레스테롤을 저하시키는 eritadenine (Suzuki and Oshima, 1976), 암세포를 억제시키는 다당체인 len-

tinan (Hamuro *et al.*, 1974; Chihara, 1993) 등의 약품으로서 인가된 성분도 있으며, 기타 버섯으로부터 유래되는 돌연변이 억제효과(김 등, 1999) 등의 연구가 있다. 그리고 항바이러스 효과(Yamamura and Cochrane, 1976)를 나타내는 생리활성 물질에 대한 연구도 진행되고 있는 등, 임산버섯의 식용, 약용 버섯은 신약개발의 중요한 천연자원으로 인정되고 있다. 최근 성인병이 늘어나면서 특히 암이나 심장질환이 증가하는 추세에 있는 바, 항종양 및 콜레스테롤의 저하작용을 가지는 버섯의 기능성성분에 관한 이용(Kawagishi *et al.*, 1990a; Kawagishi *et al.*, 1990b; 水野, 1992; Mizuno, 1995; 민 등, 1995; 차 등, 1998) 등이 새로이 주목을 받고 있다.

한편 버섯류가 생산하는 단백질 분해효소는 세포 내에 존재하는 것과 세포 외로 분비되는 것으로 나눌 수 있다(Neurath, 1989). 세포 내 존재하는 단백질 분해 효소는 비정상적인 단백질의 분해, 타단백질의 성숙, 타단백질 분비, 그리고 역할단백질을 불활성화하는 등의 역할을 담당하며, 세포 외로 분비되는 단백

질 분해효소는 세포 외에 존재하는 고분자 물질을 저분자 물질로 분해하여 세포 내 흡수를 용이도록 하는 역할을 담당하고 있다.

단백질분해효소는 미생물을 배양하거나, 과실의 열매, 동물의 위나 체장에서 추출하여 제조(Beynon and Bond, 1989; Neurath, 1989)하며, 식육의 가공 및 연화(Lee, 1986), 물고기 sauce의 숙성발효(Suh *et al.*, 1996) 등에 이용되고 있으며, 양조산업(MacGregor, 1996), 조미료산업(Diniz and Martin, 1996; Tavaría *et al.*, 1997) 등 식품공업에 널리 이용되고 있다. 현재는 거의 전량 수입되고 있는데, 그 가운데 특히 육류 외식산업의 급증으로 인하여 protease의 수요가 증가하고 있다.

능이버섯이 많은 단백질 가수분해효소(proteinase, protease)를 함유하고 있음이 보고(박, 1983a; 박, 1983b; 고, 1985; Lee *et al.*, 1989; Eun *et al.*, 1989; Uhm *et al.*, 1991)되었으며, 특히 이 버섯에 함유된 protease는 타 버섯류(Kawai and Otsuka, 1969; Terashita *et al.*, 1981; Terashita *et al.*, 1985; Terashita and Oda, 1987)에 비하여 매우 높은 단백질분해활성이 있음을 확인할 수 있었다(이 등, 2001; 조 및 조, 2004; 조 등, 2004). 그러나 능이버섯은 균근성버섯으로서 인공재배가 어려워 이 버섯으로부터 protease의 대량생산은 사실상 불가능하며, 버섯의 가격이 비싸기 때문에 값싸게 생산하기가 어려운 실정이다.

본 연구는 공시균으로서 표고버섯(*Lentinula edodes*)균을 사용, protease의 최적생산 조건을 구명하기 위하여 생산기질의 조성, 배양조건 및 배양기간 등을 검토하였으며, 생산된 protease의 효소적 특성을 구명하기 위하여 실시하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 공시재료

#### 2.1.1. 공시균

Protease 생산을 위한 공시균으로서 표고버섯균(*Lentinula edodes*, 산립 5호)을 사용하였다.

#### 2.1.2. 배지 재료

접종용 배지로서는 콩가루(Soybean flour, SF), 옥수수가루(Corn flour, CF), 카제인(Casein, C), 소맥분(Wheat flour, WF), 밀기울(Wheat bran, WB) 및 증류수(W)를 이용하여 조제하였으며, pH 4.0으로 조정, 121°C에서 60분간 멸균처리 후 사용하였다.

### 2.2 최적 배양조건

공시균은 접종용 배지에 접종하여 25°C에서 1주일간 배양하고, 이를 다시 potato-dextrose agar (PDA) 배지로 옮겨 25°C에서 1주일간 배양한 다음, 생산용 배지에 접종하여 25°C, pH 4.0의 조건에서 1주일간 진탕배양(300±20 rpm)하면서 경시적으로 protease 생산성을 측정하였다. 생산용배지로서는 밀기울 : 옥수수가루 : 증류수 = 10 : 1 : 10(옥수수기름 0.003% 첨가)으로 혼합, pH 4.0으로 조정, 121°C에서 60분간 멸균처리 후 사용하였다. Protease 생산용배지의 배양매체로서 이온교환수, pH 4.0으로 조절한 이온교환수 및 acetate buffer를 사용하여 protease 활성을 측정하였다.

### 2.2. Protease효소의 추출

진탕배양한 여액을 원심분리(15,000 rpm, 30분)하여 얻은 상등액을 감압증발기를 사용하여 35°C, 감압하에서 약 1/4의 용량으로 농축한 다음, 포화도 0.8의 황산암모늄을 가하여 단백질부분을 침전시켰다. 침전물을 증류수에 현탁시켜 visking tube에 넣어 하룻밤 투석을 행하였으며, 이를 농축하여 조protease효소로 하였다.

### 2.3. Protease효소활성의 측정

효소의 활성은 소정량의 시료를 0.1 M의 McIlvaine buffer (pH 4.0)에 녹여 1% 용액으로 하여, Casein-Folin 법(Oda and Murao, 1974)을 사용, 660 nm에서 측정하였다. Protease 1 unit는 pH 4, 37°C에서 1

ml의 효소용액에 의해 casein으로부터 1  $\mu$ g의 tyrosine이 유리되는 양으로 하였다.

### 2.4. Protease의 효소적 특성

효소의 분자량은 sodium dodecyl sulfate, polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 행하여 측정(Hames, 1984)하였으며, 분자량 표준시료로서  $\alpha$ -chymotrypsinogen (25,700), ovalbumin (45,000), bovine serum albumin (66,000)을 사용하였다. 그리고 최적 pH 및 온도안전성 등 효소의 특성(Sarath *et al.*, 1989)을 조사하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 배양기질의 조성이 protease 생산에 미치는 영향

접종용 배지로서는 콩가루(SF), 옥수수가루(CF), 카제인(C), 소맥분(WF), 밀기울(WB), 이온교환수(W) 및 옥수수기름(CO)을 Table 1과 같은 조성비로 배합하여 가장 protease 활성이 높은 조건을 조사하였다.

배지의 조성별 protease 생산성에 있어서는 WB+CF+W+CO의 조합이 84.8 U/g으로서 가장 높은 protease 생산성을 보여주었고, WB+W+CO 조합이 70.3 U/g, WB+C+W+CO 조합은 60.4 U/g으로서 밀기울과 옥수수가루가 비교적 좋은 protease 생산성을 나타냈다. 한편 SF+C+WF+W+CO 및 SF+WB+W+CO는 각각 3.05 U/g 및 40.2 U/g으로서 콩가루와 소맥분조합의 protease 생산성이 매우 낮은 것을 알 수 있었다.

### 3.2. 배양기질의 액체 조성

Protease 생산을 위한 배양매체로서 사용한 이온교환수, pH 4.0로 조절한 이온교환수 및 acetate buffer를 사용한 결과, Table 2에서 보는 바와 같이 acetate buffer에서는 전혀 protease의 생산이 되지 않았으며, pH 6.2의 이온교환수가 80.5 U/g의 가장 높은

Table 1. The effect of medium composition on protease production

Medium composition	Mixing ratio	Protease activity U/g biomass
SF+C+WF+W+CO*	10:1.7:10:10	3.05
SF+WB+W+CO*	10:10:10	40.2
WB+CF+W+CO*	10:10:10	84.8
WB+C+W+CO*	10:1.7:10	60.4
WB+W+CO*	1:10	70.3

Soybean flour: SF, Corn flour: CF, Casein: C, Wheat flour: WF, Wheat bran: WB, Deionized water: W, \*CO: Corn oil (v/v) was added 0.003% to each medium.

Table 2. The effect of different liquid media on protease production

Liquid	Protease activity U/g biomass
Deionized water (pH 6.2)	80.5
Acidified deionized water (pH 4.0)	62.3
Acetate buffer (0.1 M, pH 4.0)	-

Table 3. The effect of culture period on protease production

Culture period hr	Protease activity U/g biomass
48	49.5
60	63.3
72	90.6
84	85.4
96	60.6

protease 생산성을 나타냈다. 이 이온교환수를 pH 4.0으로 조절하였을 때 생산성은 62.3 U/g으로 낮아졌다. Protease의 활성이 pH 4.0 부근이지만 오히려 이온교환수 배양매체의 pH를 6.2로 하는 것이 더 양호한 결과를 주었으며, acetate buffer에서 전혀 protease 활성을 볼 수 없는 것은 그 이유를 알 수 없어서 금후의 검토가 필요한 부분이다.

### 3.3 배양기간의 영향

배양기간에 따른 protease 생산성은 Table 3에서 보는 바와 같이 배양시간이 경과됨에 따라 증가하였으며, 72시간 배양으로 90.6 U/g의 최대값에 달하였고, 그 이후 점차 감소하는 경향으로 나타났다. 84시

간 배양으로 85.4 U/g, 96시간이 되면서 60.6 U/g으로 84시간 이후 그 생산성이 점차 감소되는 것으로 나타났다.

### 3.4. Protease의 특성

*Lentinula edodes*를 이용하여 생산된 protease를 5~20%의 polyacrylamide 젤 전기영동 결과, single band가 관찰되었으며, 표준단백질을 이용하여 분자량을 측정된 결과, 약 45,000이었다. 균근성버섯인 송이버섯 protease의 39,000에 비하여 다소 높은 분자량을 가지고 있었으며, 기타버섯류인 표고버섯의 40,000(Terashita *et al.*, 1981), 영지버섯의 42,000, 팽이버섯의 43,000(Terashita *et al.*, 1985; Kawai and Otsuka, 1969)과 비교하였을 때 유사한 분자량을 가지고 있었다.

상이한 pH 및 온도의 조건에서 조사한 효소의 특성은 Fig. 1 및 Fig. 2에 나타났다. Fig. 1은 상이한 pH에서의 protease의 활성을 측정된 결과, 최적 pH는 4에서 나타났으며, 37°C(1시간)에서 측정된 활성은 pH 4~6 범위에 있었다. 균근성버섯인 능이버섯의 protease의 경우, pH 4에서 최적의 활성을 보였으며, pH 4~7의 범위에서 안정한 활성을 나타냈는바, 송이버섯 protease의 최적 pH는 3.25였으며, pH 2.5~5.5 범위에서 안정한 활성(Terashita *et al.*, 1987)을 나타내, 서로 유사한 최적 pH를 가지고 있었다. 그리고 표고버섯 protease의 최적 pH는 2.6(pH 2.8~5.0)(Terashita *et al.*, 1981)으로서 액체배양한 표고버섯의 protease보다 다소 낮았으며, 영지버섯의 최적 pH 6.7(5~7.8), 팽이버섯의 최적 pH 7.0(5.5~7.8)(Terashita *et al.*, 1985; Kawai and Otsuka, 1969) 등으로서 매우 높은 pH를 가지고 있었다.

Fig. 2는 protease의 온도안정성을 조사한 결과로서 최적온도는 55°C였으며, 30~60°C의 넓은 온도범위에서 안정하였으나, 60°C 이상의 온도에서는 급격한 활성저하를 보였다. 표고버섯의 50°C(Terashita *et al.*, 1981)와는 거의 유사하였고, 균근성버섯인 송이버섯 protease의 최적온도는 37°C로서 진탕배양한 표고버섯의 그것에 비하여 매우 낮았으며, 기타버섯류인 영지버섯의 43°C, 팽이버섯의 39°C(Terashita

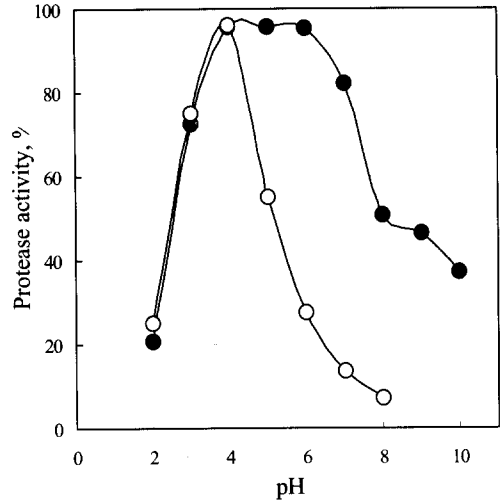


Fig. 1. Protease activity of *Lentinula edodes*.

- : Protease activity was determined by reacting casein at different pH at 37°C for 15 min.
- : The enzyme was incubated at different pH at 37°C for 1 hr. The reaction products were determined and plotted against respective pH.

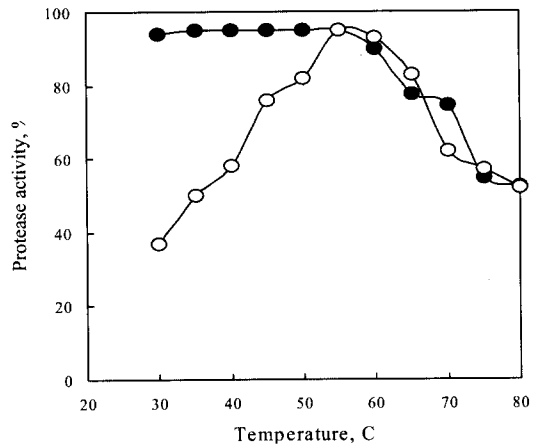


Fig. 2. Stability of protease of *Lentinula edodes*.

- : Protease activity was determined by reacting casein at different temperature at pH 4.0 for 15 min.
- : The thermal stability was determined by incubating the enzyme at different temperatures for 1 hr. The reaction products were measured and plotted against respective temperature.

et al., 1985; Kawai and Otsuka, 1969)와 비교하더라도 넓은 온도범위에서 안정함을 알 수 있어서 이 효소는 소화용 제제, 식품공업, 맥주제조업 및 가축무두질 등에 널리 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

#### 4. 결 론

본 연구는 공시균으로서 표고버섯(*Lentinula edodes*)균을 사용, protease의 최적생산 조건을 구명하기 위하여 생산기질의 조성, 배양조건 및 배양기간 등을 검토하였으며, 생산된 protease의 효소적 특성을 구명하기 위하여 실시하였다.

배지의 조성별 protease 생산성에 있어서는 밀기울 + 옥수수가루 + 옥수수기름(WB + CF + W + CO) 조합이 84.8 U/g으로서 가장 높은 protease 생산성을 보여주었고, 콩가루와 소맥분조합의 protease 생산성이 매우 낮은 것을 알 수 있었다. Protease 생산을 위한 배양 매체로서 acetate buffer에서는 전혀 protease의 생산이 되지 않았으며, pH 6.2의 이온교환수가 80.5 U/g의 가장 높은 protease 생산성을 나타냈다. 이 이온교환수를 pH 4.0으로 조절하였을 때 생산성은 62.3 U/g으로 낮아졌다. 배양시간에 따른 protease 생산성은 배양시간이 경과됨에 따라 증가하였으며, 72시간 배양으로 90.6 U/g의 최대값에 달하였고, 그 이후 점차 감소하는 경향으로 나타났다. Sephadex G-75 chromatography로 측정된 protease의 분자량은 약 45,000이었다.

*Lentinula edodes*를 이용하여 생산된 protease의 효소특성을 상이한 pH 및 온도의 조건에서 조사한 결과, 최적 pH는 4에서 나타났으며, 37°C(1시간)에서 측정된 활성은 pH 4~6 범위에 있었다. Protease의 온도안정성을 조사한 결과로서 최적온도는 55°C에서 나타났으며, 30~60°C의 넓은 온도범위에서 안정함을 알 수 있어서 이 효소는 소화용 제제, 식품공업, 맥주제조업 및 가축무두질 등 널리 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

#### 참 고 문 헌

1. 고봉경. 1985. 능이버섯의 성분연구. 고려대학교 대학원

석사학위논문.

2. 김현정, 이병훈, 김옥미, 배준태, 박선희, 박동철, 이갑광. 1999. 먹물버섯자실체 및 균사체추출물의 돌연변이억제 효과. 한국식품영양과학회지 28(2): 452~457.
3. 민두식, 조남석, 성재모, 조재명. 1995. 표고버섯. 새로운 재배와 경영. 농민신문사. pp. 65~76.
4. 박완희. 1983a. 능이의 성분에 관한 연구(제1보). 한국균학회지 11(2):85~89.
5. 박완희. 1983b. 능이의 성분에 관한 연구(제2보). 한국균학회지 11(4):159~162.
6. 이승이, 송영선, 조정원, 이종호, 조재선. 2001. 능이버섯 첨가가 우육의 물리화학적 및 관능적 특성에 미치는 영향. 한국식품영양과학회지 30(2): 266~272.
7. 조남석, 조희연. 2004. 능이자실체의 protease 활성. 목재공학 32(4): 58~65.
8. 조희연, 정선화, 조남석. 2004. 능이버섯 및 protease효소의 첨가가 연육에 미치는 영향. 목재공학(투고중).
9. 진미림, 정규선, 김병각. 1998. 잣나무 균사체로부터 분리한 단백당체의 암종에 따른 선별적 항암작용. 약학회지 42(5): 480~486.
10. 차동열, 성재모, 조남석외. 1998. 버섯학. 교학사. pp. 85~94.
11. 水野 卓, 川合正允(編著). 1992.キノコの化学・生化学. (株)學會出版センター. pp. 13~91.
12. Beynon, R. J. and J. S. Bond. 1989. Proteolytic enzymes, In: Beynon, R. J. and J. S. Bond, J. S. (ed.), A Practical Approach. IRL Press. pp. 1~4.
13. Chihara, G. 1993. Medical aspects of Lentinan isolated from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. pp. 261-266 In: Chang, S. T., Buswell, J. A. and Chiu, S. W. eds. Mushroom Biology and Mushroom Products. Proceedings of the First International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products. August 23~26, 1993, The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong.
14. Cho, H. J., M. J. Shim, E. C. Choi, and B. K. Kim. 1988. Studies on constituents of higher fungi of Korea (VII). Comparison of various antitumor constituents of *Coriolus versicolor*. Korean J. Mycol. 16: 162~174.
15. Diniz, F. M. and A. M. Martin. 1996. Use of response surface methodology to describe the combined effects of pH, temperature and E/S ratio on the hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) muscle. J. Food Engin. 31: 419~426.

16. Eun, J. S., J. H. Yang, T. K. Lee, and D. S. Choi. 1989. N-terminal amino acid sequence and some properties of proteolytic enzyme from *Sarcodon aspratus*. *Yakhak Hoeji* 33: 339~344.
17. Hames, B. D. 1984. An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis. *In: Gel electrophoresis of proteins*. Edited by B. D. Hames and D. Rickwood. IRL Press, Washington DC. pp. 1~91.
18. Hamuro, J., Y. Maeda, F. Fukuoka, and G. Chihara. 1974. Antitumor polysaccharides lentinan and pachyman as immunopotentiators. *Mushroom Science* 9: 477~487.
19. Hirase, S., S. Nakai, T. Absatsu, A. Kobayashi, M. Oohara, K. Matsunaga, M. Fujii, S. Kodaira, T. Fujii, T. Furutsho, Y. Ohmura, T. Wada, C. Yoshikumi, S. Ueno, and S. Ohtsuka. 1976a. Structural studies on the antitumor active polysaccharides from *Coriolus versicolor*. II. Structures of  $\beta$ -glucan moieties of fractionated polysaccharides. *Yakugaku Zasshi* 96: 419~424.
20. Hirase, S., S. Nakai, T. Akatsu, A. Kobayashi, M. Oohara, K. Matsunaga, M. Fujii, S. Kodaira, T. Fujii, T. Furusho, Y. Ohmura, T. Wada, C. Yoshikumi, S. Ueno, and S. Ohtsuka. 1976b. Structural studies on the antitumor active polysaccharides from *Coriolus versicolor*. I. Fractionation with barium hydroxide. *Yakugaku Zasshi* 96: 413~418.
21. Kabir, Y. and S. Kimura. 1989. Dietary mushrooms reduce blood pressure in spontaneously hypertensive rats (SHR). *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 35:91~94.
22. Kawagishi, H., M. Ando, and T. Mizuno. 1990b. Hericenone A and B as cytotoxic principles from mushroom, *Herictum erinaceum*. *Tetrahedron Letters* 31: 373~376.
23. Kawagishi, H., T. Kanao, R. Inagaki, T. Mizuno, K. Shimura, H. Ito, T. Hagiwara, and T. Nakamura. 1990a. Formolysis of a potent antitumor (1-6)- $\beta$ -D-glucan-protein complex from *Agaricus blazei* fruiting bodies and antitumor activity of the resulting products. *Carbohydrate Polymers* 12: 393~403.
24. Kawai, M. and Y. Otsuka. 1969. Screening test of basidiomycetes for the production of proteolytic enzymes and some characterization of crude enzyme. *Trans. Mycol. Soc. Japan* 10: 29~34.
25. Lee, T. K. 1986. Purification and some characterization of the proteolytic enzyme in fruit body of Neungee. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* 15: 276~285.
26. Lee, T. K., J. S. Eun, J. H. Yan, D. Y. Jo, and H. C. Yang. 1989. Purification and stability of proteolytic enzyme in *Sarcodon aspratus*. *J. Kor. Pham. Sci.* 19: 81~86.
27. MacGregor, A. W. 1996. Malting and brewing science : challenges and opportunities. *J. Institute Brewing* 102: 97~102.
28. Maruyama, F., K. Yamazaki, Murofushi, C. Kondo, and T. Ikekawa. 1989. Antitumor Activity of *Sarcodon aspratus* (BERK.) S. ITO and *Ganoderma lucidum* (FR.) Karst, *J. Pharmacobio.* 12: 118~123.
29. Mizuno, Takashi. 1995. Antitumor polysaccharides isolated from mushroom fungi. *Mushroom Sci. (Japan)* 2(3): 99~114.
30. Neurath, H. 1989. The diversity of proteolytic enzymes, *In: Beynon, R. J. and J. S. Bond, J. S. (ed.), Proteolytic Enzymes: A Pratical approach*, ISL Press, pp. 1~4.
31. Oda, K. and S. Mura. 1974. Purification and properties of carboxyl proteinase in basidiomycetes. *Agric. Biol. Chem.* 38: 2435~2437.
32. Park, Y. D., Y. K. Hong, W. K. Whang, J. D. Huh, and S. Park. 1989. Comparisons of protein-bound polysaccharide contents obtained from mycelial cultured broth and fruitbody of *Coriolus versicolor*. *Korean J. Mycol.* 17: 223~228.
33. Sakagami, Y., Y. Mizogushi, T. Shin, S. Seki, K. Kobayashi, S. Morisawa, and S. Yamamoto. 1988. Effect of an antitumor polysaccharide schizophyllan on interferon- $\gamma$  and interleukin-2 by peritoneal blood mononuclear cells. *Biochem. Biophysic. Res. Commun.* 155: 650~655.
34. Sarath, G., R. S. Motto, and F. W. Wanger. 1989. Protease assay methods, *In: Beynon, R.J. and J.S. Bond (ed.), Proteolytic Enzymes: A Pratical approach*, ISL Press. pp. 25~55.
35. Suh, H. J., S. H. Chung, J. Y. Son, H. K. Lee, and S. W. Bae. 1996. Studies on the properties of enzymatic hydrolysates from file fish (in Korean). *Kor. J. Food Sci. Technol.* 28: 678~683.
36. Suzuki, S. and S. Oshima. 1976. Influence of shiitake (*Lentinus edodes*) on human serum

- cholesterol. Mushroom Sci. 9: 463~467.
37. Tavaría, F. K., M. J. Sousa, A. Domingos, F. X. Malcata, P. Brodelius, A. Clemente, and M. S. Pais. 1997. Degradation of caseins from milk of different species by extracts of *Centaurea calcitrapa*. J. Agri. Food Chem. 45: 3760~3765.
38. Terashita, T. and K. Oda. 1987. Purification and some properties of carboxyl proteinase from *Tricholoma matsutake*. Trans. Mycol. Soc. Japan 28: 245~256.
39. Terashita, T., K. Oda, M. Kono, and S. Murao. 1981. Streptomyces pepsin inhibitor insensitive carboxyl proteinase from *Lentinus edodes*. Agric. Biol. Chem. 45(9): 1937~1943.
40. Terashita, T., K. Oda, M. Kono and S. Murao. 1985. Proteinase systems in *Flammulina velutipes* and *Pleurotus edodes*. Trans. Mycol. Soc. Japan 26: 397~409.
41. Uhm, T. B., K. S. Ryu, M. K. Kim, J. S. Yoo, H. S. Sohn, and T. K. Lee. 1991. Characterization of serine protease from Neungee (*Sarcodon aspratus*). J. Kor. Soc. Food Nutr. 20: 35~39.
42. Yamamura, Y. and K. W. Cochrane. 1976. A selective inhibitor of myxoviruses from shiitake (*Lentinus edodes*). Mushroom Sci. 9: 495~507.