

능이사실체의 Protease 활성*¹

조남석*^{2†} · 조희연*³

Protease Activity from Fruit Body of *Sarcodon aspratus**¹

Nam-Seok Cho*^{2†} · Hee-Yeon Cho*³

요 약

본 연구는 능이(*Sarcodon aspratus*)로부터 protease를 분리, 정제하고 이의 효소적 특성을 구명하고자 실시하였다. 정제가 진행되어감에 따라 protease의 비활성은 점차 증가하였는데, 탈염에 의해 비활성이 2.62배 증가하였으며, CMC column 처리로 17배, DEAE-Sephadex A-50 column 처리로 113.8배, Sephadex G-75 column 처리로 728.3배로 증가됨을 알 수 있었다. SDS-PAGE 전기영동 결과, single band의 분자량 약 43,000의 단백질을 알 수 있었다.

최적 pH 3.5 부근의 정제 protease은 pH 4.35 및 pH 4.7의 등전점을 달리하는 protease가 확인되었으며, 이들 fraction의 비활성은 각각 3,025배 및 3,257배였다. 이들 효소들은 등전점만 다를 뿐, 효소적 특성이 거의 동일하였다.

이 protease는 pH 4에서 최적의 활성을 보였으며, pH 4~7의 범위에서 안정한 활성을 나타냈다. 이 protease의 최적 온도는 40~50°C 범위였으며, 온도안정성을 조사한 결과, 60°C 이상의 온도에서 급격한 활성저하를 나타내었다. 50°C에서는 80% 정도의 활성이 유지되었으며, 60°C로 온도가 올라가면 45%, 70°C에서는 거의 활성이 나타나지 않을 정도로 미미하였고, 80°C 이상에서는 활성이 완전히 잃어버리게 됨을 알 수 있었다. 열에 대한 안정성에 있어서는 30°C 및 40°C에서 1 h 열처리에서는 매우 안정한 활성을 보였으며, 50°C에서도 70 min간 처리로 90%의 안정성을, 60°C 및 70°C에서는 10~20 min 처리로 급격한 효소의 활성저하가 시작되었으며, 70°C에서 30 min 처리로 효소의 활성이 없어짐을 알 수 있었다.

*¹ 접수 2004년 3월 9일, 채택 2004년 5월 20일

본 연구는 농림기술관리센터(99첨단, 능이생리활성 성분연구)의 연구비 지원으로 수행되었음.

*² 충북대학교 산림과학부 목재종이과학전공, Wood and Paper Science, School of Forest Resources, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

*³ 미국 데이비스캘리포니아대학 분자세포생물학연구실, Section of Molecular & Cellular Biology, University of California Davis, Davis, CA 95616, USA

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

ABSTRACT

This study was performed to investigate the protease activity from fruit body of *Sarcodon aspratus* and its features. The specific protease activity was increased with the increasing purification steps, 262 times by desalting, 17 times by CMC column chromatography, 113.8 times by DEAE-Sephadex A-50 column chromatography, and 7283 times by Sephadex G-75 column chromatography.

Proteases were identified as two different enzymes having different isoelectric points at pH 4.35 (its recovery rate 8%) and pH 4.7 (its recovery rate 3.5%). Those proteases were purified by 3,025 folds and 3,257 folds in terms of specific activity. Two proteases having different isoelectric points had similar enzymatic properties. This protease was estimated to be 43,000 daltons of molecular weights by SDS-PAGE. This protease with optimum pH 4 was almost stable in the pH range of 4~7. Optimal temperature of protease activity was 40 to 50°C, and the protease activity was completely inhibited at 70°C for 30 min.

Keywords: *Sarcodon aspratus* (Berk.), Neungi mushroom, protease, specific activity, isoelectric point

1. 서 론

균류는 일반적으로 단백질 분해효소를 합성하여 세포 외로 분비하는 것으로 알려져 있으며 (Morihara, 1974), *Conidibolus* (Srinivasan 등, 1983), *Phanerochaete chrysosporium* (Dosoretz 등, 1990), *Thermomyces lanuginosus* (Hasnain 등, 1992), *Beauveria bassiana* (Bidochka 등, 1994; Shimizu 등, 1993), 그리고 *Mucor pusillus* (Mashaly 등, 1987) 등 병원성을 일으키는 균류의 세포외 단백질 분해효소에 대한 연구가 진행된 바가 있는데, 이 단백질 분해효소가 주로 곤충 (Cole 등, 1993; Dean 등, 1983; Boucias 등, 1987)이나 식물 (Sharma, 1984; Robertsen, 1984)의 외피를 분해하여 균이 숙주에 침투할 수 있도록 하는 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다.

단백질 분해효소는 미생물을 배양하거나, 과실의 열매, 동물의 위나 췌장에서 추출하여 제조 (Beynon & Bond, 1989; Neurath, 1989)하며, 식육의 가공 및 연화 (Lee, 1986), 물고기 sauce의 숙성발효 (Suh 등, 1996) 등에 이용되고 있으며, 양조산업 (MacGregor, 1996), 조미료산업 (Diniz & Martin, 1996; Tavaría 등, 1997) 등 식품공업에 널리 이용되고 있다. 현재는 거의 전량 수입되고 있는데, 그 가운데 특히 육류 외

식산업의 급증으로 인하여 연육제의 수요가 증가하고 있다.

능이는 우리나라 및 일본에서 널리 식용되는 버섯으로서 그 향기가 높아 향버섯으로도 불리워지고 있으며, 우리나라에서는 민간약으로서 고기류를 먹고 체한데 매우 좋은 약으로 사용되어 왔다. 능이가 많은 단백질 가수분해효소 (proteinase, protease)를 함유하고 있음이 보고 (박, 1983a; 박, 1983b; 고, 1985; Lee 등, 1989; Eun 등, 1989; Uhm 등, 1991)되었으며, 특히 이 버섯에 함유된 protease는 타 버섯류 (Kawai & Otsuka, 1969; Terashita 등, 1981; Terashita 등, 1985; Terashita & Kono, 1987)에 비하여 매우 높은 단백질 분해활성이 있음을 확인할 수 있었다 (이 등, 2001).

본 연구에서는 능이로부터 protease를 분리, 정제하고 이의 효소적 특성을 구명하고자 실시하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 공시재료

1999년 10월 월악산 충북대 연습림 및 농협물류센터에서 구입한 능이 (향버섯, *Sarcodon aspratus*)를

Table 1. Purification of protease in fruit body of *S. aspratus*

Procedure	Volume ml	Total protein A ₂₈₀	Total protease U	Specific activity U/A ₂₈₀	Yield %
Homogenates	6,000	210,000	88,230	0.42	100
Concentration (35°C)	1,600	195,000	87,750	0.45	91
Desalting [0.8 sat. (NH ₄) ₂ SO ₄]	145	42,100	46,300	1.10	58
CMC column (pH 3.8)	160	3,850	27,500	7.14	35
DEAE-Sephadex A-50 column	150	410	19,600	47.8	24
Sephadex G-75 (pH 4.0)	85	425	13,000	305.9	16
EF chromatography a) (pH 4.35)	10	51	6,480	1,270.6	8
b) (pH 4.70)	5	22	3,010	1,368.2	35

-28°C 이하의 냉동고에서 급속히 냉동시킨 상태로 저장하여 공시하였다.

2.2. Protease 효소의 추출

동결시킨 능이 10 kg에 0.1 M의 McIlvaine buffer (pH 5.0) 10 리터를 가하고, 믹서로 분쇄하여 원심분리(15,000 rpm, 30 min)하여 얻은 추출액의 상등액 6 리터를 조효소 추출용 시료로 사용하였다. 이 조효소액을 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 protease 조효소로 이용하였다.

2.3. Protease 효소활성의 측정

Protease 조효소의 활성은 소정량의 시료를 0.1 M의 McIlvaine buffer (pH 4.0)에 녹여 1% 용액으로 하여, Casein-Folin 법(Oda & Murao, 1974)을 사용, 660 nm에서 protease 활성을 측정하였다.

2.4. Protease 조효소의 정제

Protease 조효소액 시료에 0.8로 포화된 황산암모늄을 가하여 염석, 투석한 다음, carboxymethyl cellulose column (pH 3.8)에 통과시켜 이에 흡착되지

않는 부분을 모아서 DEAE-Sephadex A-50을 사용하는 column chromatography (pH 6.2)를 행하여 활성을 띄는 fraction을 모았다. 이 용리액을 한외여과장치로 농축시키고, Sephadex G-75를 사용, Gel permeation chromatography (column 내경 1.5×90 cm, pH 4.0)를 행하였으며, 또한 초점전기영동(Electrofocusing electrophoresis, EF) chromatography (ampholine을 포함하는 LKB column, pH 3.5~6, 4°C, 300 V, 48 h)을 행하여 효소(Sarath 등, 1989; 水野, 1992)를 정제하였다.

2.5. Protease의 특성

정제된 protease의 분자량은 sodium dodecyl sulfate, polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 행하여 측정(Hames, 1984)하였으며, 분자량 표준 시료로서 α-chymotrypsinogen (25,700), ovalbumin (45,000), bovine serum albumin (66,000)을 사용하였다. 그리고 pH, 온도, 기질농도 등에 따른 활성변화 등 효소의 특성(Sarath 등, 1989)을 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Protease의 분리 및 정제

자실체로부터 분리한 protease 조효소를 5단계로 정제하여 Table 1과 같은 결과를 얻었다. 정제가 진

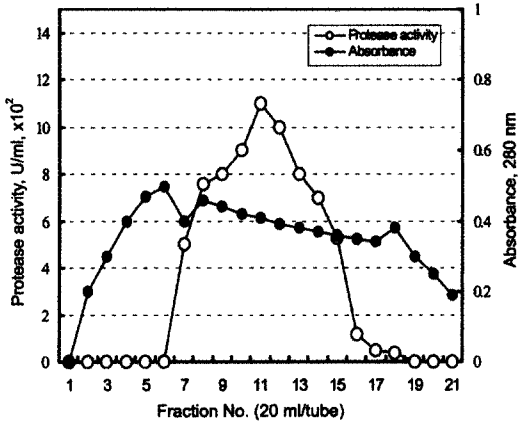


Fig. 1. Column chromatography of protease on a DEAE-Cellulose column.

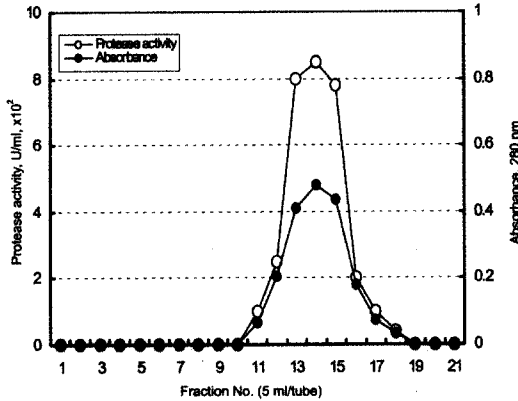


Fig. 2. Column chromatography of protease on Sephadex G-75.

행되어감에 따라 protease의 총활성은 감소하고 있지만 비활성은 점차 증가하였다. 황산암모늄의 탈염만에 의한 비활성은 2.62배 증가하였으며, CMC column 처리로 17배, DEAE-Sephadex A-50 column 처리로 113.8배의 활성증가를 나타냈다. 나아가서 Sephadex G-75 column 처리로 728.3배로 증가됨을 알 수 있었다. Sephadex G-75 정제단계에서의 protease 비활성은 305.9 U로서 같은 균근성버섯인 송이의 protease 활성(Terashita & Kono, 1987)과 유사하였다.

Fig. 1은 DEAE-Cellulose column 처리에 의한 protease의 활성을 나타낸 결과인데, 단백질 fraction의

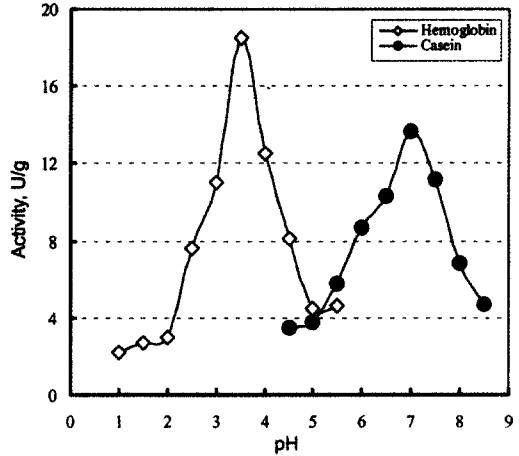


Fig. 3. pH - protease activity curves of protease in fruitbody of *S. aspratus*.

활성은 전체 분획영역에 걸쳐 매우 넓은 분포를 가졌으며, protease 활성은 120 ml로부터 320 ml 사이에서 감지되었으며, 비활성이 47.8 U이었다. Fig. 2는 상기 용리액을 다시 Sephadex G-75 column으로 정제한 결과, 단백질의 활성과 protease의 활성이 일치하였으며, protease 비활성이 305.9 U였다.

3.2. 능이균이 생산하는 protease

능이의 자실체에는 어떠한 protease가 존재하는가를 살펴보기 위하여 각종 pH의 0.1 M McIlvaine 완충용액에 casein 및 hemoglobin을 각각 용해시킨 것을 기질로 하여 기질농도 1%에서 효소의 검색을 실시하였으며, 그 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 최적 pH 3.5 부근 및 최적 pH 7.0 부근의 2종류의 protease가 있음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 송이의 경우, 배양여과액 중의 protease는 pH 3 부근에서 최적 pH를 가지고 있었던 반면, 균사 및 자실체로부터 분리한 protease는 pH 3 및 pH 6.5에서 최적 pH를 가진다는 보고(Terashita & Kono, 1987)와 유사한 결과를 보여주었다.

능이의 protease를 CMC column, DEAE-Sephadex A-50 column 및 Sephadex G-75로 정제한 다음, 최적 pH 3.0 부근의 protease를 사용하여 초점전기영

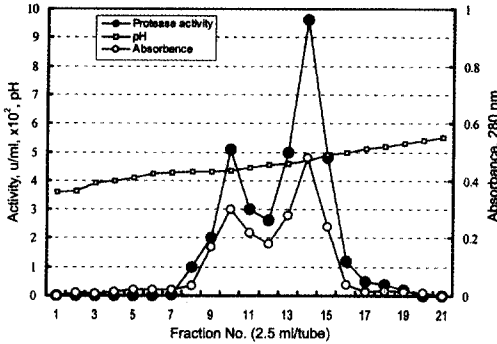


Fig. 4. Isoelectric focusing pattern of protease in fruitbody extracts of *S. aspratus*.

동을 수행하여 Fig. 4에서 보는 바와 같이 pH 4.35 및 pH 4.7의 등전점을 달리하는 protease가 있음을 확인하였다. 아울러 Table 1에서 보는 바와 같이 정제 결과, 이들의 회수율이 등전점 pH 4.35(a)가 8%, pH 4.70(b)이 3.5%였으며, 이들 fraction의 비활성은 각각 3,025배 및 3,257배로 상승하였다. 이들 효소들은 등전점만 다를 뿐, 효소적 특성이 거의 동일하였다.

3.3. Protease의 효소적 특성

pH 4.0의 McIlvaine 완충액으로 일정하게 희석한 시료용액에 casein 기질용액을 가하여 37°C에서 60 min간 반응시키고 그 흡광도를 측정 한 결과, 효소농도 0.4% 이상이 되면 흡광도와 효소농도가 비례하지 않았으므로 효소의 농도를 0.4% 이하로 하여 효소의 활성을 측정하였다.

4~20%의 polyacrylamide 젤 전기영동을 한 결과, single band만이 관찰되었는데 이로써 효소가 순수 분리되었음을 확인할 수 있었고, 표준단백질을 이용하여 분자량을 산출한 결과, 효소가 약 43,000의 분자량을 갖고 있었다. 균근성버섯인 송이버섯 protease의 39,000에 비하여 다소 높은 분자량을 가지고 있었으며, 기타버섯류인 표고버섯의 40,000(Terashita 등, 1981), 영지버섯의 42,000, 팽이버섯의 43,000(Terashita 등, 1985; Kawai & Otsuka, 1969)과 비교하였을 때 유사한 분자량을 가지고 있었다.

한편 protease를 polyacrylamide 젤에 없기 전에

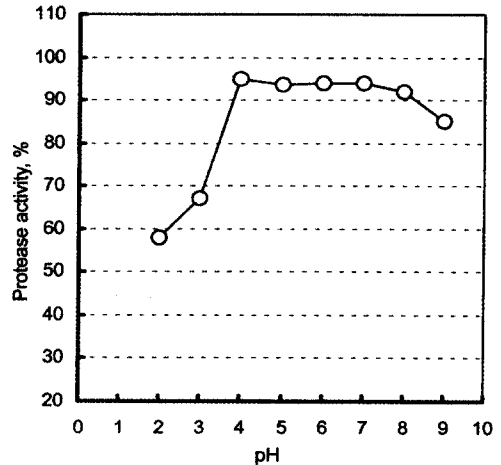


Fig. 5. pH stability of protease enzyme.

효소를 sample buffer와 섞어 100°C에서 증탕하는 단계에서 효소의 자가분해성으로 인해 효소 스스로가 분해되어 젤상에서 약 10여개의 bands로 나타나는 것을 관찰할 수 있었는데, 효소를 sample buffer에 넣어 증탕할 때 효소활성 저해제인 phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) 0.1 μg을 첨가하므로써 효소의 활성이 저해되어, 자가분해가 일어나지 않게 되어 젤상에서 single band만이 나타났다. 이러한 이유로 전기영동 수행시에 시료는 효소와 sample buffer에 PMSF를 넣은 상태에서 증탕하여 준비하였다. 효소의 최대활성을 보이는 온도인 65°C에서 효소를 15~30 min 간격으로 정지한 후 polyacrylamide 젤을 통해 단백질 band의 변화를 관찰한 결과, 65°C에서 정지한 시간이 길어질수록 단백질 band의 농도가 감소함을 관찰할 수 있었고, 이를 통해 이 효소는 자가분해능을 가진 효소임을 알 수 있었다.

효소활성을 측정시, 분석시와 동일한 pH 4.0의 1 M McIlvaine 완충용액을 사용하여 pH 2~9의 범위에서 protease의 pH안정성을 측정하였고, Fig. 5에서 보는 바와 같이 protease는 pH 4에서 최적의 활성을 보였으며, pH 4~7의 범위에서 안정한 활성을 나타냈다. 균근성버섯인 송이버섯 protease의 최적 pH는 3.25였으며, pH 2.5~5.5 범위에서 안정한 활성(Terashita 등, 1987)을 나타내 서로 유사한 최적 pH를 가지고 있었다. 그리고 표고버섯 protease의 최적

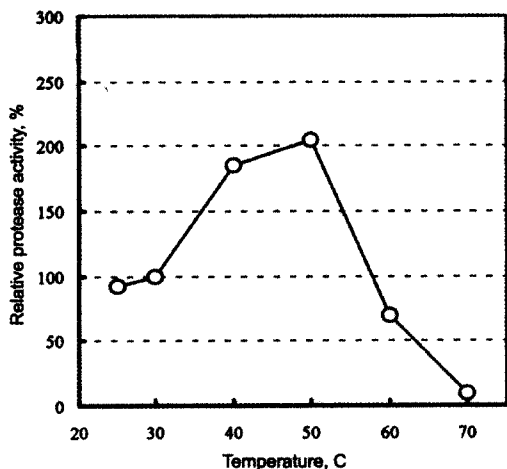


Fig. 6. Optimum temperature of protease enzyme.

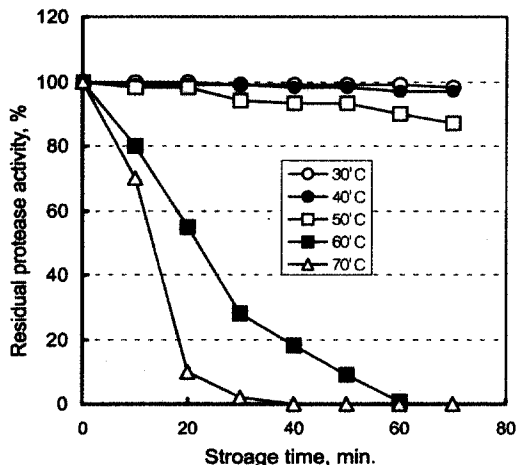


Fig. 8. Thermal stability of protease during storage at different temperatures.

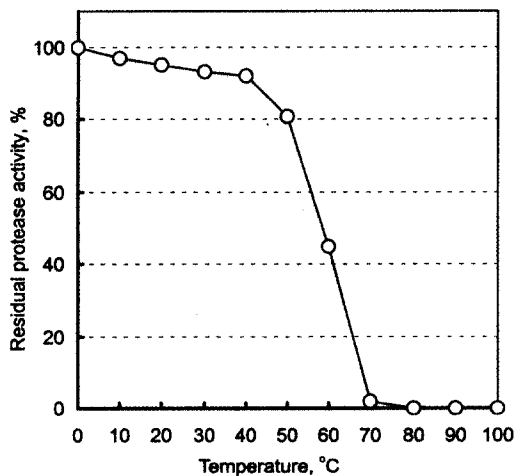


Fig. 7. Thermal stability of protease by heating at different temperatures for 1 hr.

pH는 2.6(pH 2.8~5.0)(Terashita 등, 1981)으로서 능이의 protease보다 다소 낮았으며, 영지버섯의 최적 pH 6.7(5~7.8), 팽이버섯의 최적 pH 7.0(5.5~7.8)(Terashita 등, 1985; Kawai & Otsuka, 1969)은 능이의 protease보다 훨씬 높은 pH를 가지고 있었다.

Fig. 6은 효소의 최적온도를 알기 위하여 pH 4.0의 0.1 M McIlvaine 완충용액에 30°C에서의 효소활성을

100%로 하고 온도를 높이면서 상대활성을 조사한 결과, 최적 온도가 40~50°C 범위였으며, 최고의 활성 값은 30°C의 그것보다 1.5~2배 정도였다. 균근성버섯인 송이버섯 protease의 최적온도는 37°C로서 능이의 그것에 비하여 다소 낮았으며, 기타버섯류인 표고버섯의 50°C(Terashita 등, 1981), 영지버섯의 43°C, 팽이버섯의 39°C(Terashita 등, 1985; Kawai & Otsuka, 1969)와 비교하였을 때 유사한 최적온도값을 가지고 있었다.

Fig. 7은 protease의 온도안정성을 조사한 결과로서 protease를 casein을 기질로 하여 온도를 변화시켜가면서 1 h 동안 열처리하였을 때 효소의 활성 안정성을 조사한 결과, 40°C까지는 90% 가까운 효소활성을 유지하고 있었으며, 온도가 40°C가 지나면서 급격한 활성저하를 나타내었다. 50°C에서는 80% 정도의 활성이 유지되었으며, 60°C로 온도가 올라가면 45%, 70°C에서는 거의 활성이 나타나지 않을 정도로 미미하였고, 80°C 이상에서는 활성을 완전히 잃어버리게 됨을 알 수 있었다.

Fig. 8은 각각의 온도에서 1 h 이상 효소를 방치하였을 때 열에 대한 안정성을 조사한 결과, 그림에서와 같이 30°C 및 40°C에서는 거의 1 h 열처리가 계속되어도 매우 안정한 활성을 보였으며, 50°C에서도 70 min간 처리로 90% 가까운 열 안정성을 나타내고 있

다. 이에 대하여 60°C 및 70°C에서는 10~20 min 처리로 급격한 효소의 활성저하가 시작되었으며, 70°C 처리의 경우는 30 min 처리로 거의 모든 효소의 활성이 없어짐을 알 수 있었다.

4. 결 론

본 연구에서 추출한 능이(*Sarcodon aspratus*)의 protease 효소는 정제가 진행되어감에 따라 protease의 비활성은 점차 증가하였다. 황산암모늄의 탈염만으로도 비활성은 2.62배 증가하였으며, CMC column 처리로 17배, DEAE-Sephadex A-50 column 처리로 113.8배의 활성증가를 나타냈다. 나아가서 Sephadex G-75 column 처리로 728.3배로 증가됨을 알 수 있었다. 이 protease는 polyacrylamide 겔로 전기영동을 한 결과, single band를 가진 약 43,000의 분자량을 갖는 단백질임을 알 수 있었다.

최적 pH 3.5 부근의 능이의 정제 protease의 초점 전기영동을 수행한 결과, pH 4.35 및 pH 4.7의 등전점을 달리하는 protease가 있음을 확인하였으며, 이들의 회수율이 등전점 pH 4.35(a)가 8%, pH 4.70(b)이 3.5%였으며, 이들 fraction의 비활성은 각각 3,025배 및 3,257배로 상승하였다. 이들 효소들은 등전점만 다를 뿐, 효소적 특성이 거의 동일하였다.

이 protease는 pH 4에서 최적의 활성을 보였으며, pH 4~7의 범위에서 안정한 활성을 나타냈다. 이 protease의 최적 온도가 40~50°C 범위였으며, 최고의 활성값은 30°C의 그것보다 1.5~2배 정도였다. Protease의 온도안정성을 조사한 결과, 40°C까지는 90% 가까운 효소활성을 유지하고 있었으며, 온도가 40°C가 지나면서 급격한 활성저하를 나타내었다. 50°C에서는 80% 정도의 활성이 유지되었으며, 60°C로 온도가 올라가면 45%, 70°C에서는 거의 활성이 나타나지 않을 정도로 미미하였고, 80°C 이상에서는 활성이 완전히 잃어버리게 됨을 알 수 있었다. 열에 대한 안정성을 조사한 결과, 30°C 및 40°C에서는 거의 1 h 열처리에서는 매우 안정한 활성을 보였으며, 50°C에서도 70 min 처리로 90%의 안정성을, 60°C 및 70°C에서는 10~20 min 처리로 급격한 효소의 활성저하가 시작

되었으며, 70°C 처리의 경우는 30 min 처리로 거의 모든 효소의 활성이 없어졌다.

참 고 문 헌

1. 고훈경. 1985. 능이버섯의 성분연구, 고려대학교 대학원 석사학위논문.
2. 박완희. 1983a. 능이의 성분에 관한 연구(제1보), 한국균학회지 11(2): 85~89.
3. 박완희. 1983b. 능이의 성분에 관한 연구(제2보), 한국균학회지 11(4): 159~162.
4. 이승이, 송영선, 조정원, 이종호, 조재선. 2001. 능이버섯 첨가가 우육의 물리화학적 및 관능적 특성에 미치는 영향, 한국식품영양과학회지 30(2): 266~272.
5. 水野 卓, 川合正允(編著). 1992. キノコの化學・生化學. (株)學會出版センター. pp. 13~91.
6. 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.
7. Bidochka, M. J. and G. G. Khachatourians. 1994. Protein hydrolysis in grasshopper cuticles by entomopathogenic fungal extracellular proteases, J. Invertebr. Pathol. 63: 7~13.
8. Boucias, D. G. and J. C. Pendland. 1987. Detection of protease inhibitors in the hemolymph of resistant *Anticarsia gemmatilis* which are inhibitory to the entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*. Experientia 43: 336~338.
9. Cole, S. C. J., A. K. Charnley, and R. M. Copper. 1993. Purification and partial characterization of a novel trypsin-like cysteine protease from *Metarhizium anisopliae*, FEMS. Microbiol. Letter 113: 189~196.
10. Dean, D. D. and A. J. Domnas. 1983. The extracellular proteolytic enzymes of the mosquito-parasitizing fungus, *Lagenidium giganteum*. Exp. Mycol. 7: 31~39.
11. 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 dog fish (*Squalus acanthias*) muscle. J. Food Engin. 31: 419~426.
12. Dosoretz, C. G., H. C. Chen, and H. E. Grethlein.

1990. Effect of environmental conditions on extracellular protease activity in lignolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*, Appl. Environ. Microbiol. 56: 395-400.
13. 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.
 14. 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.
 15. Hasnain, S., K. Adeli, and A. C. Storer. 1992. Purification and characterization of an extracellular thiol-containing serine protease from *Thermomyces lanuginosus*. Biochem. Cell. Biol. 70: 117~122.
 16. 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.
 17. 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.
 18. Lee, T. K., J. S. Eun, J. H. Yan, D. Y. Jo, H. C. Yang. 1989. Purification and stability of proteolytic enzyme in *Sarcodon aspratus*. J. Kor. Pharm. Sci. 19: 81~86.
 19. MacGregor, A. W. 1996. Malting and brewing science : challenges and opportunities. J. Institute Brewing 102: 97~102.
 20. Mashaly, R. I., S. A. Mohamed, M. K. Tahoun, A. A. Ismail, and M. S. Mohamed. 1987. Purification and characterization of *Mucor pusillus* extracellular protease. Indian J. Dairy Sci. 40: 315~321.
 21. Morihara, K. 1974. Comparative specificity of microbial proteinases, Adv. Enzymol. Areas Mol. Biol. 41: 179~243.
 22. Neurath, H. 1989. The diversity of proteolytic enzymes, In: Beynone, R. J. and J. S. Bond, J. S. (ed.), Proteolytic Enzymes: A Practical approach, ISL Press, pp. 1~4.
 23. Oda, K. and S. Murao. 1974. Purification and properties of carboxyl proteinase in basidiomycetes. Agric. Biol. Chem. 38: 2435~2437.
 24. Robertsen, B. 1984. An alkaline extracellular protease produced by *Ladosporium cucumerinum* and its possible importance in the development of scab disease of cucumber seedling. Physiol. Plant Pathol. 24: 83~92.
 25. Sarath, G., R. S. Motto, and F. W. Wanger. 1989. Protease assay methods, In: Beynone, R. J. and J. S. Bond(ed), Proteolytic Enzymes: A Practical approach, ISL Press. pp. 25~55.
 26. Sharma, R. C., S. L. Sharma, and I. Sharma. 1984. Protease activity of *Sclerotinia sclerotiorum* causing stalk rot of cauliflower. Indian Phytopathol. 37: 531~534.
 27. Shimizu, S., Y. Tsuchitani, and T. Matsumoto. 1993. Production of 5 extracellular protease by *Beauveria bassiana* in the haemolymph of the silkworm. *Bombyx mori*. Appl. Microbiol. 16: 291~294.
 28. Srinivasan, M. S., H. G. Vartak, V. K. Powar, and I. I. Sutar. 1983. High activity alkaline protease production by *Conidiobolus* sp. Biotechnol. letter 5: 285~288
 29. 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.
 30. Tavarua, 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.
 31. Terashita, T. and K. Oda. 1987. Purification and some properties of carboxyl proteinase from *Tricholoma matsutake*. Trans. Mycol. Soc. Japan 28: 245~256.
 32. 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.
 33. 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.
 34. 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.