

연어정자로부터 제조된 프로타민의 항균성 및 항산화성

주동식 · 조순영 · 강현주 · 진덕희* · 이창호**
강릉대학교 동해안해양생물자원연구센터,
*강릉대학교 해양생명공학부, **강릉대학교 생물학과

Antimicrobial and Antioxidant Activity of Protamine Prepared from Salmon Sperm

Dong-Sik Joo, Soon-Yeong Cho, Hyun-Joo Kang, Deok-Hee Jin* and Chang-Ho Lee**

East Coastal Marine Bioresources Research Center, Kangnung National University,

*Faculty of Marine Bioscience & Technology, Kangnung national University,

**Department of Biology, Kangnung National University

Abstract

Protamine-strong basic protein was prepared from salmon(chum salmon, *Oncorhynchus keta*) sperm by several pretreatment method. And there were determined yield, amino acid composition, antimicrobial and antioxidant activity of protamine on each pretreatment condition. The yield of protamine was different according to pretreatment, and ultrasonicating, homogenizing and microwaving pretreatment were about 16.0%, 15.5% and 10%, respectively. The main amino acid of P60(microwaving pretreatment for 10 min at 80°C) and UU6(ultrasonicating pretreatment for 60 min at 20°C) were arginine, proline and tryptophan, and arginine content of P60 and UU6 were 61%, 53%, respectively. On the other hand, main amino acid of M(homogenizing pretreatment by mixer) were methionine, proline and arginine, the content were 34%, 28% and 11%, respectively. Also MC(homogenizing pretreatment with H₂SO₄ soln. by mixer) was very different with P60, UU6 and M, the content of MC were proline 44.8% and arginine 39.7%. Prepared protamines showed antimicrobial activity to several gram(+) and gram(-) strain. In particular, the UU6 and P60 protamine has strong antimicrobial activity to *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*, and the activity was increased with concentration increasing. Regardless of pretreatment method, all protamine showed antioxidant activity and the ED₅₀ of P60, UU6, M and MC were 101 µg/mL, 410 µg/mL, 523 µg/mL and 490 µg/mL, respectively.

Key words : salmon sperm, protamine, antimicrobial and antioxidant activity

서 론

프로타민은 단백질의 일종으로 연어, 송어, 상어 등과 같은 어류의 세포핵에서 얻어지는 염기성이 강한 nucleoprotein으로 분자량이 3,000~10,000 정도로 작고, arginine 질소 함량이 매우 높아 50~90% 이상을 차지하는 것으로 알려져 있다^(1,4). 이러한 프로타민은 혈압강하, 항혈액응고능, 혈당량 저하능 및 항균활성과 같은 생리 기능 특성도 가지는 것으로 보고되어 있고^(1,5), 실제 항균활성을 이용한 식품보존제로서 산업적

이용이 이루어지고 있으며⁽⁶⁾, 특히 포도상 구균과 같은 gram(+) 균에 효과가 큰 것으로 알려져 있다⁽⁵⁾.

한편, 동해안으로 회귀하는 연어로부터 다량 생산되는 연어알은 전량 치어육성용으로 사용되지만 연어정자는 일부만 사용되고 나머지는 폐기되고 있는 실정이다. 이 폐기되는 연어정자로부터 프로타민 및 DNA를 분리하여 천연 항균제나 천연 항산화제(항산화제)로서 식품이나 의약품 등의 고부가가치적 이용이 가능할 것으로 판단된다. 특히 국내에서는 많은 종류의 천연 항균제나 항산화제에 대해 연구가 이루어져 있지만^(7,8), 프로타민과 같은 제품의 산업적 생산 및 이용은 거의 없는 상태이며 이와 관련하여 지속적인 연구가 필요하다. 또한, 회귀 연어의 수를 늘리기위한 다양한 연구가 이루어지고는 있지만, 회귀 연어의 적절한 이용 방안이 확립되어 있지 않으면 회귀 연어를 늘

Corresponding author : Soon Yeong Cho, East Coastal Marine Bioresources Research Center, Kangnung National University, Jibeon Dong 123, Kangnung city
Tel : 82-33-640-2335
Fax : 82-33-648-3831
E-mail : csykang@knusun.kangnung.ac.kr

리기위한 노력은 의미가 없어진다.

따라서 본 연구에서는 회귀 연어로부터 정자를 획득하여, 기존의 산처리법⁽³⁾ 이외에 연어정자로부터 효율적인 프로타민을 분리하는 방법을 모색하고자 다양한 방법으로 프로타민을 제조하여 아미노산 조성, 단백질 순도에 대한 특성을 실험하였고, 분리된 프로타민의 항균성 및 항산화성에 대해 시험하였다.

재료 및 방법

원료 및 시약

연어 정자는 강원도 양양지역으로 회귀하는 연어(chum salmon, *Oncorhynchus keta*)를 양양 내수면 연구소에서 직접 채취하여 원료로 사용하였다. 실험에 사용한 황산은 특급 시약을 사용하였고, 그 외의 시약은 화학 실험용을 사용하였다.

프로타민 추출

원료 연어 정자의 일반성분은 상법에 따라 분석하였다. 프로타민의 추출은 기존의 방법으로 Motohiro의 방법⁽³⁾을 참조하여 Fig. 1과 같은 과정으로 행하였다. 즉, 원료 정자를 믹서를 이용하여 잘 분쇄하고 5% H₂SO₄를 60 mL 첨가하여 상온에서 하룻밤 동안 교반하면서 프로타민을 추출하였다. 이것을 7,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 분리하였고, 침전물에 5% H₂SO₄를 60 mL 재첨가하여 한 번 더 동일한 조건에서 추출작업을 반복하여, 1차 상층액과 2차 상층액을 합한 다음, 여기에 2배량의 냉 에탄올을 가하여 0°C 저온실에서 하룻밤 방치하였다. 이것을 3,500 rpm에서 15분간 원심분리하여 침전물을 분리하였고, 이 침전물에 80°C의 온수를 30 mL 정도 가하여 용해한 다음 12,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 침전물에 대해 동일한 작업을 반복하여 상층액을 얻어 0°C에서 하룻밤 방치후, 상층액을 조심스럽게 제거하고 침전물에 온수를 소량 가하여 녹인 다음 동결건조하여 프로타민을 획득하였다. 물리적 추출 방법에 따른 프로타민의 수율을 확인하기 위해 믹서를 이용한 원료 처리 방법 대신에 황산을 가한 다음, 25°C에서 60분간 초음파 처리(VCX 600-20 kHz, tapered microtips-φ 3 mm, Sonic & Materials Inc., U.S.A.)와 80°C에서 10분간 마이크로파 처리(MDS 2000, CEM Co., U.S.A.)를 행하였다.

프로타민 수율

수율은 원료의 고형분 함량에 대해 동결건조하여 얻

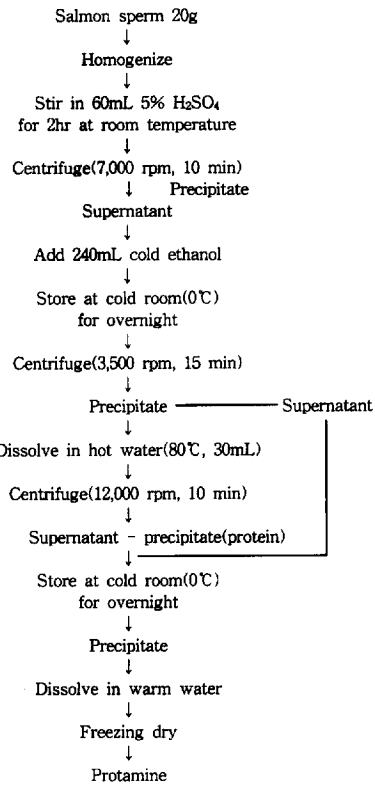


Fig. 1. Flowsheet for protamine extraction from salmon sperm.

어진 프로타민의 함량비로 나타내었다.

아미노산 분석

프로타민 시료를 일정량 취하여 6N HCl을 이용하여 가수분해한 다음, 이 가수분해액 50 μL를 취하여 PICO-tag 방법⁽⁹⁾을 이용하여 PITC 라벨을 하였고, 라벨된 시료를 10 μL 취하여 HPLC로 분석하였다⁽¹⁰⁾.

항균성 실험

항균성 실험에 사용한 균주로는 그람 양성균으로 *Bacillus subtilis* KCTC 1021, *Staphylococcus aureus* KCTC 1916, *Enterobacter aerogenes* KCTC 2190을, 그람 음성균으로 *Pseudomonas aeruginosa* KCTC 1636, *Escherichia coli* KCTC 1039를 이용하였으며, 곰팡이로는 *Aspergillus niger* KCTC 6007, *Penicillium chrysogenum* KCTC 6052를 효모로는 *Candida utilis* KCTC 7247을 사용하였다. 배지로 세균은 nutrient agar를, 곰팡이는 yeast-malt extract agar를 이용하였고, 측정은 미리 제조한 agar plate 위에 12시간 균 배양액을 도말한 다음 멸균된 disk paper를 올려놓고 일정량의

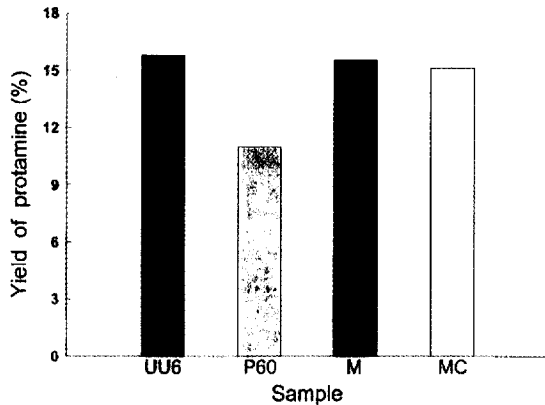


Fig. 2. Comparison of protamine yield according to pretreatment method.

UU6-extraction after microwaving for 10 min at 80°C, M-extraction after homogenizing by mixer, MC-homogenizing extraction with H₂SO₄ soln. by mixer.

프로타민(1.6 mg, 3.2 mg) 용액을 가하여 12시간 및 24 시간 배양한 후 형성된 clear zone의 크기로부터 항균 활성을 측정하는 disk paper법⁽¹¹⁾으로 행하였다.

항산화성 실험

항산화능은 전자공여능을 측정하여 간접적으로 확인하였다⁽¹²⁾. 전자공여능(EDA, electron donating ability)은 각 시료의 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)에 대한 전자공여효과로서 시료의 환원력을 측정하였는데, 소정의 농도로 조절된 시료 200 µL에 0.4 mM DPPH 용액(99.9% ethanol에 용해)을 800 µL를 가하여 10초간 Vortex로 혼합한 다음 실온에서 10분간 방치한 후 525 nm에서 흡광도를 측정하여 EDA[% = (1-(시료첨가구 흡광도/blank 흡광도)×100)]를 측정하였고, EDA가 50% 되는 시료 농도(EDA₅₀, µg/mL)로 각 시료 간의 항산화능을 비교하였다.

결과 및 고찰

프로타민 추출 수율

연어 정자의 수분함량은 90.5%, 조단백질은 8.5%, 조지방 및 회분 함량은 각각 0.4% 정도였는데, 수분을 제외하면 대부분이 단백질이라는 사실을 확인할 수 있었고, 지방질 함량이 적다는 것이 매우 특징적이었다. 프로타민의 수율은 전처리 방법에 따라 차이를 보여주고 있는데(Fig. 2), 전체적으로 초음파 전처리를 행한 시료가 처리 시간에 관계없이 프로타민 추출에 가장 효과적임을 알 수 있었고, 수율은 연어정자 고형분

Table 1. Amino acid composition of protamine prepared from salmon sperm(%)

	S ¹⁾	M	MC	P60	UU6
Cys	0.01	0.21	-	0.1	-
Asp	0.06	-	-	-	-
Glu	0.07	0.03	0.01	0.03	0.01
Ser	7.05	3.47	5.71	5.74	6.53
Gly	3.83	6.17	4.12	4.08	5.20
His	0.13	0.01	-	-	-
Arg	61.08	19.34	39.74	60.80	52.38
Thr	0.25	0.05	0.03	0.04	-
Ala	0.93	0.14	0.60	0.54	-
Pro	11.43	28.08	44.84	22.51	3.23
Tyr	0.03	0.02	0.01	0.01	-
Val	5.48	3.59	1.35	3.50	4.45
Met	7.95	34.33	0.01	0.01	12.67
Cys2	10.06	0.02	-	-	-
Ile	1.38	1.54	1.60	1.02	1.41
Leu	0.09	0.09	-	0.01	-
Phe	0.12	0.04	0.01	-	-
Trp	0.01	2.85	1.89	1.54	13.39
Lys	0.03	0.03	0.07	0.02	-

¹⁾S: standard, M: extraction after homogenizing by mixer, MC: homogenizing extraction with H₂SO₄ soln. by mixer, P60: extraction after microwaving for 10 min at 80°C, UU6: extraction after ultrasonication for 60min at 20°C

함량에 대해 16% 정도였다. 이러한 처리가 어떤 기작을 통해 프로타민 추출에 효과적인지 확실하게는 알 수 없으나, 초음파 처리가 연어정자 중의 DNA나 다른 단백질과 결합된 프로타민을 분리하는데 효과적인 역할을 한다는 것을 예측할 수 있었다. 한편, 5% 황산을 직접 첨가하여 균질화시킨 경우에도 15% 정도의 수율을 나타내었는데, 이는 황산 첨가 방법이 수율에는 별다른 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다. 마이크로 전처리의 경우, 처리강도에 관계없이 온도를 80°C로 유지시킴으로써 단백질 변성이 유발되어 부분적으로 단백질의 영킴을 확인할 수 있었는데, 이러한 현상이 프로타민 추출 수율에 영향을 주어 추출 수율이 10% 정도로 다른 전처리 구간에 비해 5% 이상 낮은 결과를 나타내었다. 상기한 프로타민의 수율은 참치 백자가 1% 정도⁽⁷⁾, 연어 백자가 5% 정도⁽¹⁰⁾인 것과 비교해볼 때, 추출 방법에 관계없이 높았는데, 원료의 프로타민의 함량에서 기인하는 것으로 판단된다. 아울러 본 실험에서 얻어진 프로타민 시료는 순도 검정이 되어 있지 않은 상태로 프로타민 이외의 단백질로 혼합되어 있을 가능성이 있는 것으로 판단된다. 수율의 측면에서만 본다면 초음파 전처리가 다른 물리적 전처리보다 효과적이라는 것은 확실하지만, 추출된 프로타민의 항균활성과 항산화성 등의 실험 결과를 고려하여 전처리 방법을 결정되어야 할 것으로 판단되었다.

Table 2. Antimicrobial activity of protamine prepared from salmon sperm

Micro-organism	Protamine		S ¹⁾		UU6		P60		M		MC	
	A ²⁾	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
<i>B. subtilis</i> KCTC1021	++	++	++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++
<i>St. aureus</i> KCTC 1916	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	+
<i>Ent. aerogenes</i> KCTC 2190	+	+	++	++	++	++	+	++	+	++	+	+
<i>Pseu. aeruginosa</i> KCTC 1636	+	+	+	++	+	++	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i> KCTC 1039	+	++	++	+++	++	++	+	++	+	++	+	++
<i>C. utilis</i> KCTC 7247	+-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pen. chrysogenum</i> KCTC 6052	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Asp. niger</i> KCTC 6007	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Inhibition zone; -, none, +: <1 mm, ++: 1~3 mm, +++: 3~7 mm, ++++: >7 mm.

¹⁾S: standard, M: extraction after homogenizing by mixer, MC: homogenizing extraction with H₂SO₄ soln. by mixer, P60: extraction after microwaving for 10min at 80°C, UU6: extraction after ultrasonication for 60min at 20°C.

²⁾Concentration of test sample; A: 1.6 mg/disk paper, B: 3.2 mg/disk paper.

프로타민의 아미노산 조성

각 전처리 조건에 따라 제조된 프로타민의 아미노산 조성을 분석한 결과는 Table 1과 같다. 시판 프로타민의 경우 arginine 함량이 61% 정도를 차지하였고, proline 함량은 11% 정도로, 이러한 조성은 전형적인 프로타민의 아미노산 조성 과 유사한 것으로 확인되었다. 본 연구의 전처리 조건에 따라 얻어진 프로타민의 아미노산 조성은, 황산용액으로 균질화하여 추출한 M의 경우 arginine 함량이 19% 정도였고, 반면 methionine과 proline이 각각 34%와 28% 정도를 차지하였다. 균질화시킨 다음 황산으로 추출한 MC에서도 전형적인 프로타민의 아미노산 조성과는 차이를 보여주고 있는데, proline과 arginine이 각각 44.8%와 39.7%로 전체 아미노산의 80% 이상을 차지하였다. 이러한 결과는 원료에서 기인하는 것도 있지만 추출 과정 중에 다른 단백질의 혼입 가능성이 있는 것으로 판단된다. 하지만 마이크로파 전처리로 추출한 P60과 초음파 전처리로 추출한 UU6는 arginine이 각각 60.8%, 52.4% 정도였고, proline이 각각 20%, 4% 정도로 시판품과 유사한 아미노산 조성을 나타내었는데, UU6의 경우 proline 함량이 낮은 반면 tryptophan 함량이 13.4% 정도로 다소 높은 것으로 확인되었다. 이 정도의 차이는 원료가 가지고 있는 차이일 것으로 판단되며, Jeon 등⁽¹³⁾도 연어와 참치 백자로부터 추출된 프로타민의 아미노산 조성에서 큰 차이가 있다는 사실을 확인한 바 있다. 한편, M의 경우 다른 전처리로 제조된 프로타민보다는 훨씬 낮은 arginine 함량을 보여주고 있는데, 제조 공정의 차이와 다른 단백질의 혼입도 추측해 볼 수 있겠으나, 전기영동상에서 정확하게 확인되지 않아 향후 겔크로마토그래피로 정제하고 아미노산 분석을 통해 확인될 수 있을 것으로 판단된다.

프로타민의 항균 활성

전처리 방법을 달리하여 제조한 프로타민의 항균력을 비교할 결과, Table 2에 나타난 것처럼 곰팡이를 제외한 그람양성 및 그람 음성균의 성장을 대부분 억제하였으며, 특히 그람 양성균인 *B. subtilis*와 그람 음성균인 *E. coli*에 대해 활성이 높은 것으로 나타났다. Nazrul 등⁽¹⁴⁾은 연어와 청어에서 제조한 프로타민이 *Bacillus* sp.의 포자 발아를 억제한다는 사실을 보고한 바 있는데, 본 실험에서 나타난 결과도 유사한 작용에 의해 항균활성을 나타내는 것을 생각되었다. 한편, Motohiro 등⁽⁹⁾이 보고한 것처럼 그람음성균에 대해서만 활성이 강하게 나타나지는 않았으며, Jeon 등⁽¹³⁾의 보고와 차이가 있음이 확인되었다. 이러한 결과는 프로타민 추출 원료가 다른 것에서 일차적인 이유가 있을 것으로 판단되며, 그 다음으로 만들어진 프로타민의 순도, 분자 크기 및 아미노산 조성에 따른 차이일 것으로 추측되지만, 본 연구에서 만들어진 시료의 전기영동 결과가 확실하지 않아 이 부분에 대해서는 다시 확인해볼 필요가 있을 것 같다. 본 실험에서는 초음파 전처리로 제조된 UU6나 마이크로파 전처리로 제조된 P60이 다른 시료에 비해 항균활성이 높았는데, 분자량의 크기는 확인할 수 없었지만, arginine 함량이 많다는 사실로 미루어볼 때 순도나 프로타민의 순도나 아미노산 조성에서 기인하는 것으로 판단되었다. 그러나 전체 아미노산 조성은 UU6와 P60도 차이를 보여주고 있으며, 특히 methionine과 tryptophan 함량에서 큰 차이를 보여주고 있으며, 아울러 일부 균주에 대해서는 본 시험 물질에 대해 농도 의존성이 있음도 확인되었다. 그리고, 시판 프로타민에 비해서 제조된 시료가 항균활성이 높음을 알 수 있었는데, 이는 시판 프로타민의 경우 판매를 위해 프로타민에 중량 및 안

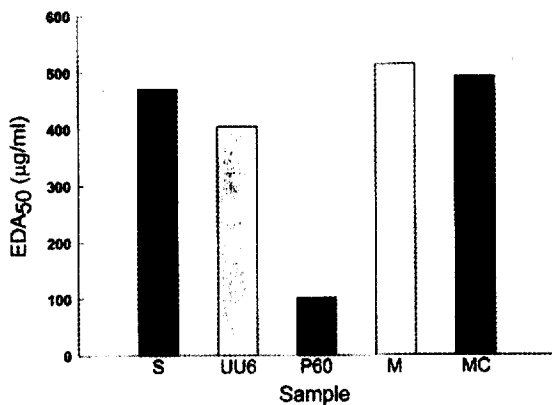


Fig. 3. Antioxidant activity of protamine from salmon sperm and marketing protamine.

S-marketing protamine, UU6-extraction after ultrasonication for 60 min at 20°C, P60-extraction after microwaving for 10 min at 80°C, M-extraction after homogenizing by mixer, MC-homogenizing extraction with H₂SO₄ soln. by mixer.

정제를 첨가하여 전체적인 프로타민의 농도가 낮아진 것에도 그 원인이 있는 것으로 판단된다. 한편, 효모인 *C. utilis*에 대해서도 일부 시험 시료에서 증식 억제 능력이 확인되었으며, 세균에서와 마찬가지로 UU6와 P60 시료에서 그 활성이 높음을 알 수 있었다. 이상의 항균 활성 시험에서 프로타민의 제조 방법에 따라 활성의 차이가 있음이 확인되었기에 항균물질로서의 용도로 프로타민을 제조할 경우, 초음파 전처리나 마이크로파 전처리 방법을 이용하는 것이 효과적일 것으로 판단되었다. 아울러 초음파 전처리가 마이크로파 전처리보다 5% 이상의 높은 수율을 보여 항균 활성과 수율로 판단해볼 때 초음파 전처리에 의한 추출법이 가장 적절한 방법임이 확인되었다.

프로타민의 항산화성

프로타민의 항산화성은 전처리 방법에 관계없이 모든 시험 시료에서 확인되었으며, 전처리 방법에 따라 그 효과가 약간씩 차이가 있었다. 시험 시료 중 마이크로파 전처리된 P60이 가장 높은 항산화 활성을 나타내었으며, EDA가 50%가 되는 EDA₅₀를 측정할 결과(Fig. 3), P60이 101 µg/mL, UU6가 410 µg/mL, M이 520 µg/mL, MC가 490 µg/mL였으며, 시판 프로타민은 470 µg/mL이었다. 이러한 결과는 프로타민이 항산화성이 있다는 증거이며, DNA가 함유되어 있을 것을 판단되는 프로타민 추출 잔사는 EDA가 낮게 나타났다. 그러나 프로타민의 항산화성에 대한 실험 결과는 이전에 보고된 바 없기에, 정확한 DNA 함량과 프

로타민 함량을 확인한 다음 결론을 내리는 것이 바람직할 것으로 판단되었다. Nazrul 등⁽¹⁴⁾은 프로타민이 열에 매우 안정하여 autoclaving하여도 항균 활성에 큰 영향을 받지 않는다고 하였는데, 본 연어 정자 프로타민도 열안정성에 대한 실험을 통해 확인해야 하겠지만, 멸균 공정을 거치는 고부가가치 식품의 보존제 등으로 다양하게 이용할 수 있을 것으로 판단되었다.

요 약

폐기되는 연어 정자로부터 프로타민을 제조하여 프로타민이 가지는 항균성 및 항산화성을 시험하였다. 그 결과 제조시 전처리 방법에 따라 추출 수율이 차이가 있었는데, 초음파와 균질기 전처리에 의한 추출 방법은 수율에 큰 차이를 보이지 않았지만, 80°C로 가열되는 마이크로파 전처리는 다른 전처리 시료에 비해 5% 이상 수율이 낮았다. 각 조건별로 제조된 프로타민 시료들의 아미노산 분석 결과, 시판 프로타민의 경우 arginine 함량이 전체 61.1% 정도를 차지하였고, proline 함량은 11% 정도였다. H₂SO₄ 용액으로 균질화하여 추출한 M의 경우 arginine 함량이 19.3% 정도였고, 반면 methionine과 proline이 각각 34.3%, 28.1% 정도를 차지하였으며, 균질화시킨 다음 H₂SO₄ 용액으로 추출한 MC도 시판 프로타민과 유사한 조성을 나타내었다. 마이크로파 전처리 P60 및 초음파 전처리 UU6는 arginine이 각각 60.8%, 52.4%를 차지하였고, P60은 proline 함량이, UU6는 tryptophan 함량이 다소 많은 것이 차이였다. 제조된 프로타민은 곰팡이 이외에 그람양성 및 음성 세균에 대해 항균활성이 있었고, UU6나 P60이 다른 시료에 비해 활성이 높았고, 일부 세균에 대해서는 농도 의존성이 있으며, 시판 제품보다 높은 항균활성을 나타내었다. 프로타민의 항산화성은 전처리 방법에 관계없이 모든 시료에서 확인되었으며, 전처리 방법에 따라 어느정도 차이를 보였다. EDA₅₀를 측정할 결과, P60이 101 µg/mL, UU6가 410 µg/mL, M이 520 µg/mL, MC가 490 µg/mL였으며, 시판 프로타민은 470 µg/mL였다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 지정 강릉대학교 동해안 해양생물자원연구센터의 지원에 의한 것입니다. 아울러 아미노산 분석에 도움을 준 기초과학지원연구소에 감사드립니다.

문헌

1. Kodaka, A. and Nozaka, N. The present situation of food preservative developing in natural production. Japan Food Sci. 5: 25-34(1984)
2. Yamashita, H., Yoshino, T., Kikuchi, H., Tsukamoto, K. and Sato, T. Utilization of food of salmon spermary extract. New Food Industry 29: 82-86(1987)
3. Motohiro, T. Development of food preservatives and antimicrobial properties of protamine. Bioindustry 6: 105-117(1989)
4. Noma, T. Isolation of protamine sulfate from bonito, *katsuwonus vagans* lesson, and its some properties. Bull. of Jap. Soc. Sci. Fish. 26:21-24(1960)
5. Motohiro, T. Antimicrobial action of gram negative bacteria by protamine. Japan Food Sci. 6:57-63(1989)
6. Sanyo Shokuhin Co. The collaboration to the occupancy developing of natural preservative protamine. Japan Food Sci. 9:76-77(1988)
7. Al-Delaimy, K. S. and Ali, S. H. Antimicrobial action of vegetable extracts on the growth of pathogenic bacteria. J. Sci. Food Agric. 21:110-112(1970)
8. Nakatani, N. and Kikuzaki, H. A new antioxidative glucoside from oregano(*Origanum vulgare* L.). Agric. Biol. Chem. 51:2727-2732(1987)
9. Waters Co. Pico-Tag Amino Acid Analysis System Operation Manual. p.1. Waters Co. Press, USA(1966)
10. Tarr, G. E. Methods of Protein Microcharacterization. pp.155-194. J. E. Shively, (ed.). Humana Press, Clifton, NJ, USA(1986)
11. Lorian, V. Antibiotics Laboratory Medicine. pp.17-105. Williams & Wilkins, Baltimore, USA(1991)
12. Okubo, K. Studies of Functional Food 2. Saponine and its SOD. pp. 16-21. Japan Scientific Societies Press Center, Japan(1995)
13. Jeon, T. W., Kim, J. H. and Park, K. M. Antimicrobial activity and characteristics of protamine extracted from tuna spermary. Korean J. Food Sci. Technol. 31:540-546(1999)
14. Narzul, MD. I., Motohiro, T. and Itakura, T. Inhibitory effect of protamine on the growth from the spores of two *Bacillus* sp. Bul. Jap. Soc. Sci. Fish. 52:913-917(1986)

(1999년 10월 18일 접수)