

## 미국자리공 (*Phytolacca americana* L.) 뿌리의 항균 펩타이드 정제 및 특성연구

김정주 · 장혜영<sup>1</sup> · 김재호\*

경성대학교 생물학과, <sup>1</sup>고신대학교 생명과학과

(2003년 9월 8일 접수, 2003년 10월 16일 수리)

미국자리공(*Phytolacca americana* L.) 뿌리에서 항균 펩타이드를 분리하여 PAMP-r로 명명 하였다. 분리는 DEAE-cellulose, sephadex G-75, Mono S, Resource RPC등을 거쳐 이루어 졌으며 최종산물은 15% SDS-PAGE 에서 약 4,900 Da의 분자량을 보였다. PAMP-r는 광범위한 항균활성을 나타냈으며 온도와 pH변화에도 높은 안정성을 보였다. 항균활성은 80°C에서 30분동안 유지될 뿐만 아니라 pH도 3.0의 산성에서부터 pH 8.0의 알칼리에 이르기까지 광범위한 범위 안에서 안정하게 나타났다.

**Key words:** pokeweed, *Phytolacca americana* L, antimicrobial peptide

### 서 론

모든 생물은 다양한 환경 및 병원균으로부터 스스로를 보호 하는 자가 방어 기작을 가진다. 고도로 발달된 고등동물의 면역계에 비하여 식물의 자가보호 기작은 비교적 할 수 없이 단순하나, 여러 외부 병원균에 대항할 수 있는 다양한 방어 기작을 가지고 있다. 이러한 방어 기작은 세균의 침입에 대항하여 세포벽을 목질화하는 등의 물리적 방어기작과 병원균에 대응하여 저분자 물질을 생산하는 생화학적 방어기작으로 나누어 볼 수 있다.<sup>1)</sup>

식물의 생화학적 자가 방어기작에는 여러 가지 단백질 분자들이 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며, 이러한 단백질들을 통칭하여 defense-related protein이라 부른다.<sup>2)</sup> 이러한 defense-related protein에는 곰팡이와 세균의 세포벽 성분인 chitin과 glucan을 분해하는 chitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase 등을 포함하는 antifungal hydrolase가 있으며,<sup>3,5)</sup> rRNA의 특정부위(3'-AGUACGAGAGGA-5')의 adenine에 특이적인 N-glycosidase 활성을 통해 ribosome을 불활성화 시키므로써 ribosome과 elongation factor간의 GTP 의존적인 결합을 방해하여 단백질 합성 자체를 방해하는 ribosome-inactivating protein<sup>6-8)</sup>과 thionin,<sup>9)</sup> plant defensin,<sup>2)</sup> hevein-like peptide,<sup>10)</sup> knottin-like peptide<sup>11)</sup> 등이 알려져 있다.

미국자리공의 경우에도 antiviral activity를 갖는 PAP,<sup>12,13)</sup> 혈구 응집력과 mitogenic activity를 가지는 PL-A, B,<sup>14)</sup> 작은 peptide 형태로 antimicrobial activity를 갖는 PAFP,<sup>15)</sup> Pa-AMP<sup>16)</sup>와 Pa-AFP<sup>17)</sup> 등의 defense-related protein 들이 알려져 있다.

특히 PAFP와 Pa-AMP, Pa-AFP는 최근에서야 발견된 작은 peptide로서, 이들 각각은 아미노산 서열 분석 결과 동일한 것

으로 여겨지며, 38개의 아미노산 잔기를 갖는 분자량 4,000 Da 정도의 염기성 peptide로, 종자 발아 시 세균의 침입을 막는 방편으로 작용한다고 알려져 있다.<sup>15-17)</sup> 이들은 또한 종자에서만 특이적으로 발견된다고 보고되어 있으며,<sup>16,17)</sup> gram positive bacteria와 토양 유래 곰팡이에 동시에 강력한 항균력을 나타낸다고 알려져 있다.<sup>16)</sup>

이러한 식물의 defense-related protein들은 다양한 산업적 잠재력을 가지므로 여러 연구자들이 활발히 탐색하고 그 기능을 추적하고 있다. 본 연구는 민간에서 수종, 이노, 신장염의 약제로 쓰이는 미국자리공의<sup>18)</sup> 뿌리에서 위와 유사한 항균활성을 가지는 물질을 탐색하여 새로운 항생제로 개발하거나 식품의 저장 및 화장품 등에 첨가할 수 있는 천연방부제로서의 역할을 모색해 보고자 한다.

### 재료 및 방법

**실험재료.** 본 실험에 사용한 미국자리공(*Phytolacca americana* L.)은 경성대학교 북쪽인 금련산 동남 사면에 자생하는 것으로서, 5월 말부터 10월 사이에 채취하여 초저온 냉동고(-70°C)에 보관하였다가 사용하였다.

**사용균주 및 배지.** 본 실험에 사용된 균주는 그람 양성균 5종, 그람음성균 4종, 효모 2종과 곰팡이 1 종을 사용하였으며 균주의 종류와 배지 및 배양 조건은 Table 1에 나타내었다. 항균력 시험에 사용된 균주는 각각의 액체배지에서 전배양하여 O.D.(Optical density) 값을 일정하게 하였다. 곰팡이의 경우 5 ml의 멸균생리식염수에 한 백금이 현탁하여 사용하였다. 배지는 균주의 특성에 맞게 제조하여 121°C, 1.5 기압 하에서 15분간 멸균하여 사용하였다.

**시약 및 기구.** 시약으로는 Chromatography resin으로서, DEAE cellulose 는 MERCK(USA), Sephadex G-75은 Sigma Co.(USA), Mono S HR 5/5와 Resource RPC는 Phamacia Biotech(Sweden)것을 사용하였고, 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-

\*연락처자

Phone: 82-51-620-4644; Fax: 82-51-627-4115

E-mail: jhkim@star.ks.ac.kr

Table 1. List of microorganism used for antimicrobial activity test

strain	Cultivation condition
Gram positive bacteria	
<i>Bacillus subtilis</i> KCTC 1022	Nutrient media, 30°C, Aerobic
<i>Lactobacillus brevis</i> KCCM 35464	MRS media, 37°C, Aerobic
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM 12116	MRS media, 37°C, Aerobic
<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1916	Nutrient media, 37°C, Aerobic
<i>Streptococcus faecalis</i> 12S001 IMSUN 10234	MRS media, 25°C, Aerobic
Gram negative bacteria	
<i>Enterobacter cloacae</i> (KSM)	Nutrient media, 37°C, Aerobic
<i>Escherichia coli</i> KCTC 2443	Nutrient media, 37°C, Aerobic
<i>Klebsiella pneumoniae</i> IMSUN 10254	Nutrient media, 37°C, Aerobic
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KCTC 1636	Nutrient media, 25°C, Aerobic
Yeast	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IAM 4512	Malt extract media, 30°C, Aerobic
<i>Saccharomyces formosus</i> Taiken BNU 2234	Malt extract media, 30°C, Aerobic
Fungi	
<i>Trichoderma viride</i> ATCC 32098	PDA media, 25°C, Aerobic

2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT), Tris-base, EDTA, glycine 등은 Sigma Co. 것을 acrylamide, sodium dodecyl sulfate(SDS), N,N-methylene-bis-acrylamide(Bis), tricine,  $\beta$ -mercaptoethanol, coomassie brilliant blue R-250, G-250, molecular weight marker 등은 Bio-Rad(USA) 제품을 사용하였고, acetonitril과 trifluoroacetic acid(TFA), methanol은 HPLC grade의 MERCK 제품을 이용하였으며, 그 외 모든 시약은 특급품을 사용하였다.

실험에 사용된 기구로는 Mini-protean II electrophoresis kit, Mini trans-bolt cell(이상 Bio-Rad), GeneQuant pro RNA/DNA calculator, Acta purifier(이상 Pharmacia Biotech.), iEMS analyzer(Labsystems), high speed centrifuge(Supra 22K, Korea), freezing dryer(Irsin, Korea), microcentrifuge(Hanil, Korea), ice maker(Hanil, Korea), incubator(Samhwa, Korea) 등을 사용하였다.

**PAMP-r의 분리.** 미국자리공 뿌리 1 kg을 500 ml의 10 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 분쇄하여 원심분리(4°C, 12,000 rpm, 20 min)하고 상등액을 60%~95% ammonium sulfate로 포화, 침전 시켰다. ammonium sulfate분획은 투석 후 DEAE cellulose column(5×20 cm, 40 ml/hr)을 통과시켜 항균 활성 부분을 확인 한 후, 다시 Sephadex G-75(2.5×100 cm, 15 ml/hr)에 주입하여 50 mM sodium phosphate buffer(containing 0.1 M NaCl, pH 7.2)로 유출시키고 단백질 분획을 280 nm로 확인 하였다.

Sephadex G-75 통과 후 항균활성을 보이는 단백질 분획 5 mg/ml을 FPLC Mono S HR 5/5(Pharmacia Co.)에 주입한 후, 2 M NaCl(in 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0)로서 0.5 ml/min의 속도로 linear gradient(0-1 M, 40 min)하여 유출시켰다.

Mono S column에서 항균활성이 있는 분획 중 4번째 분획을 선택하여 Acta purifier FPLC system(Pamacia Biotech.)을 사용하여 Resource RPC column(Pharmacia Co.) 상에서 80% acetonitrile(in 0.052% TFA)으로 linear gradient(0~50%, 40

min), 0.5 ml/min의 속도로 유출시켜 단일 peak를 확인하였다.

**분자량 측정.** 분자량 측정을 위한 SDS-PAGE는 Laemmli의 방법<sup>19)</sup>에 따라 4% stacking gel과 15% separating gel로 수행한 후 Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하였다. SDS-PAGE를 위한 sample 8  $\mu$ l에 2X loading buffer 8  $\mu$ l와  $\beta$ -mercaptoethanol 1.5  $\mu$ l를 첨가한 후 90°C에서 5분간 열처리하여 사용하였다.

**항균 활성 조사.** 형광색의 tetrazolium salt인 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)는 dehydrogenase에 의해 자주빛의 결정을 만들어 560 nm에서 최대 흡광도를 보인다.<sup>20,21,22)</sup> MTT는 주로 진행 세포의 생존, 증식을 측정하는데 주로 사용되었으나, 원핵의 dehydrogenase에 또한 반응하는 것으로 알려져 있다.<sup>23,24)</sup> 분리한 항균 peptide의 활성은 백<sup>24)</sup>의 방법을 변형하여 수행하거나 paper-disc를 이용한 감수성 표준반응을 사용하였다.

600 nm에서 흡광도가 0.3이 되도록 희석한 균 배양액 10  $\mu$ l에 5  $\mu$ l의 단백질 분획을 첨가하여 2시간 동안 전배양 한 후 96 well microtiter plate를 이용하여 각 well 당 총 100  $\mu$ l가 되도록 배지를 첨가한 후, 4시간 후에 MTT solution(5 mg/ml in PBS) 10  $\mu$ l를 첨가하고, 30분 후에 100  $\mu$ l의 acidic isopropanol(0.04 N HCl in isopropanol)을 첨가하여 formazan을 녹인 후 iEMS analyzer (Labsystems)에서 540 nm의 파장으로 흡광도를 측정하였다.

**생육저해 효과 측정.** 항균력 시험을 통해 민감한 반응을 보였던 *Bacillus subtilis*와 *Saccharomyces formosus*에 대한 생육억제도를 시간별로 알아보았다. 600 nm에서 흡광도가 0.3이 되도록 희석한 균 배양액 10  $\mu$ l와 5  $\mu$ l의 단백질 분획을 첨가하여 2시간 동안 전배양 한 후 96 well microtiter plate를 이용하여 각 well 당 총 200  $\mu$ l가 되도록 배지를 첨가한 후 8시간 동안 매 2시간 간격으로 iEMS analyzer(Labsystems)에서 540 nm의 파장으로 흡광도를 측정하였다.

**Growth inhibition concentration 50% (IC<sub>50</sub>) 측정.** 분리된 PAMP-r의 균성장 저해 정도를 알아보기 위하여 항균활성

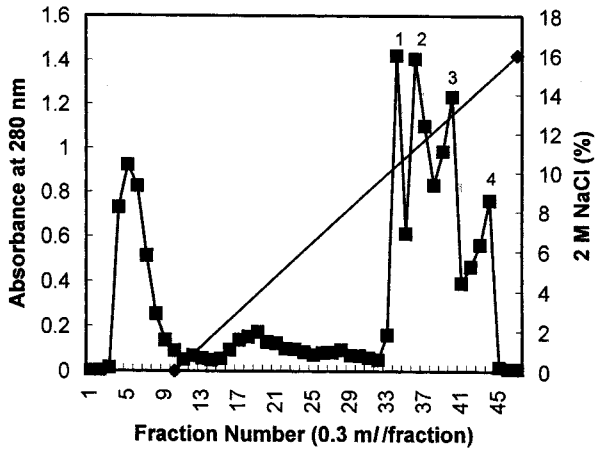


Fig. 1. Mono S cation exchange chromatography.

시험에서 높은 민감도를 보인 *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloacae*와 *Saccharomyces formonsis*를 사용하여 PAMP-r 농도를 419 ng, 41.9 ng, 27.9 ng, 13.9 ng가 되게 단계적으로 희석한 sample을 가해 MTT assay를 수행한 후 iEMS analyzer(Labsystems)에서 540 nm에서 발색정도를 측정하여 IC<sub>50</sub>을 구하였다.

**항 곰팡이 활성 검증.** 곰팡이를 사면 배지에서 한 백금이 떠서 5 ml의 생리식염수에 현탁하여 사용하였다. petri-dish에 곰팡이 현탁액을 200 µl를 떨어뜨린 후 PDA 배지 10 ml를 50°C 정도로 식힌 후 첨가하여 굳힌 후 지름 6 mm의 멸균된 paper disc를 올려놓은 다음 80 µl의 시료를 disc에 흡수시켜 48~60시간 배양한 후 disc 주변의 균 성장 저지 영역을 확인하였다.

**pH 안정성 측정.** 분리된 peptide를 pH 3~10의 buffer에 녹여 4°C에서 1시간 둔 후, 다시 pH 7.0으로 조절한 후, *Bacillus subtilis*의 성장저해 효과 유무를 MTT assay로 측정하여 잔류활성을 조사하였다. 각각 다른 pH의 buffer는 pH 3~6은 50 mM citrate-phosphate buffer, pH 7은 50 mM phosphate buffer, pH 8~9는 50 mM Tris-Cl buffer, pH 10은 50 mM carbonate-biscarbonate buffer를 사용하였다.

**온도 안정성 측정.** 분리된 peptide를 20~100°C까지의 여러 온도에서 30분간 둔 다음, 즉시 4°C로 냉각시킨 후, *Bacillus subtilis*의 성장저해 효과 유무를 MTT assay로 측정하여 잔류활성을 조사하였다.

**결과 및 고찰**

**PAMP-r(Poekweed AntiMicrobial Peptide from root)의 정제.** 미국지리공 뿌리를 분쇄한 후 앞에서 기술한대로 60~95% ammonium sulfate fractionation, DEAE cellulose anion exchange chromatography, Sephadex G-75 gel filtration chromatography, Mono S cation exchange chromatography, Resource RPC reverse-phase chromatography를 이용하여 항균력을 갖는 단백질을 분리하였다. 각 분리 단계 분획의 항균활성의 검증은 선행실험에서 가장 민감한 반응을 보였던 *Bacillus*

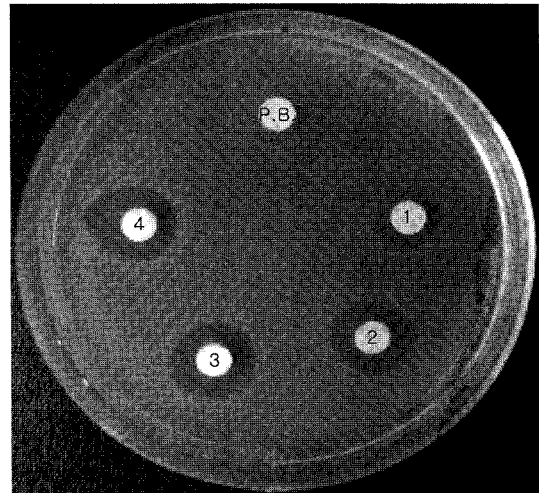


Fig. 2. Growth inhibition of Mono S cation exchange chromatography peaks on *B. subtilis*. Each disc has 80ul of proper samples. P.B., 10 mM phosphate buffer; 1, peak1; 2, peak2; 3, peak 3; 4, peak 4.

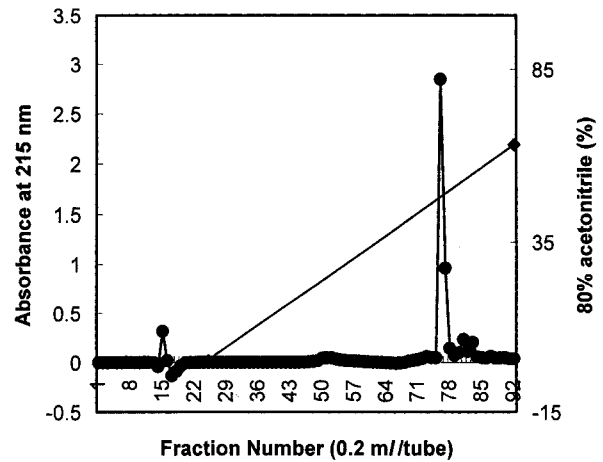


Fig. 3. Resource RPC reverse phase chromatography.

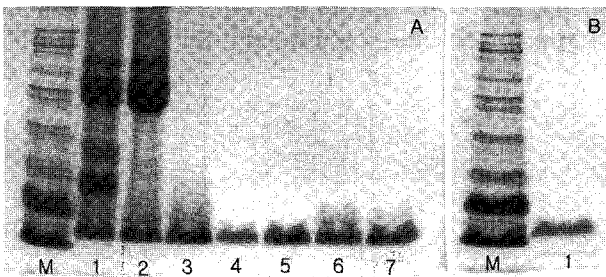
*subtilis*(KCTC 1022)의 생장억제 정도로 확인하였다. 60~95% ammonium sulfate fractionation으로 침전된 단백질 용액은 DEAE cellulose anion exchange chromatography 되었으며 항균 활성이 있는 분획은 column을 바로 통과하였다. 모아진 분획을 농축하고 탈염하여 Sephadex G-75 gel filtration chromatography를 수행하였다. 항균활성이 있는 35~45번 분획을 모아 다시 Mono S cation exchange chromatography를 수행하였다(Fig. 1). Mono S column에 bound된 시료는 2 M NaCl을 이용하여 linear gradient(0-1 M NaCl, 40 min)로 대략 0.2 M~0.3 M NaCl 정도에서 유출되었다. 여기에서 얻어진 peak들은 활성은 달랐지만 모두 *Bacillus subtilis*의 성장을 억제시켰다(Fig. 2). 그러나 SDS-PAGE 상에서 이들 peak를 이루는 단백질들의 이동은 차이를 인식할 수 없었다(Fig. 4A). 이들은 각각의 구조에서나 혹은 구성 아미노산에 있어서 전기영동 상에서는 판별될 수 없는 약간의 차이가 있을 것이라 추정된다.

Mono S peak 중 마지막 4번째 분획은 Resource RPC

**Table 2. Antimicrobial activities of PAMP-r from roots of pokeweed**

strain	Inhibition efficacy
Gram positive bacteria	
<i>Bacillus subtilis</i> KCTC 1022	++++
<i>Lactobacillus brevis</i> KCCM 35464	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM 12116	-
<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1916	++++
<i>Streptococcus faecalis</i> 12S001 IMSUN 10234	+
Gram negative bacteria	
<i>Enterobacter cloacae</i> (경성대 미생물실)	++++
<i>Escherichia coli</i> KCTC 2443	++
<i>Klebsiella pnunonia</i> IMSUN 10254	+++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KCTC 1636	+
Yeast	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IAM 4512	++++
<i>Saccharomyces formonsis</i> Taiken BNU 2234	++++

(++++, inhibition of 90% or more; +++, inhibition of 70% or more; ++, inhibition of 40% or more; +, inhibition of 10% or more; -, inhibition of 10% and less)

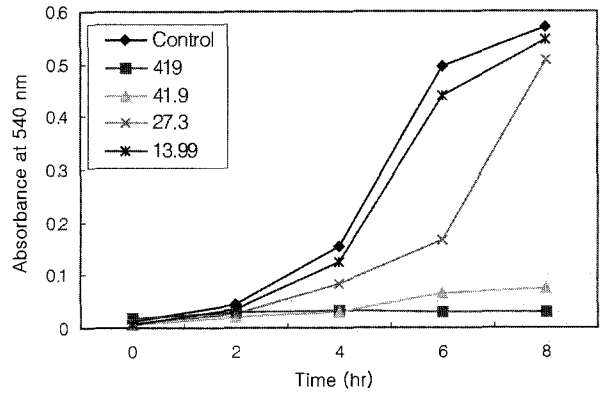


**Fig. 4. Protein profile with purification steps on 15% acrylamide gel electrophoresis.** A: Purification step, M, mixture of size marker (phosphorylase b: 97,400, serum albumin: 66,200, ovalbumin : 45,000, carbonic anhydrase: 31,000, trypsin inhibitor: 21,500, lysozyme: 14,400, aprotinin 6,500, insulin  $\beta$ -chain 3,495); 1, Total extract; 2, DEAE Sample; 3, Sephadex G-75 Sample; 4, Mono S Sample 1; 5, Mono S Sample 2; 6, Mono S Sample 3; 7, Mono S Sample 4. B: Molecular weight, M, size marker; 1, Resource RPC sample.

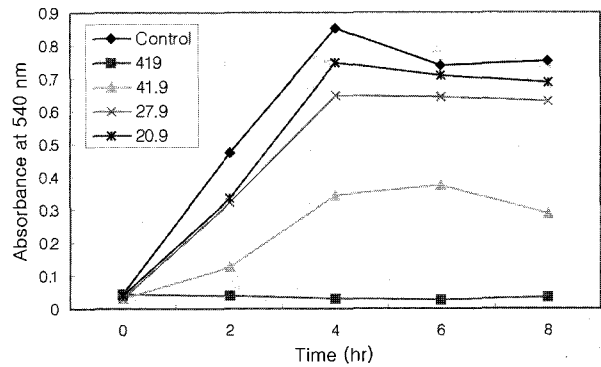
column을 이용한 reverse-phase chromatography 상에서 80% acetonitrile(containing 0.052% TFA)를 linear gradient(0~50%, 40 min)로 적용시켰을 때 하나의 뚜렷한 peak를 형성함으로써 순수분리를 확인하였다(Fig. 3).

Fig. 4A는 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis 결과로서 세포분쇄액(lane 1)이 DEAE(lane 2), Sephadex G-75(lane 3), Mono S(lane 4-7)의 단계에 따라 점차 분리되어가는 모습을 나타내고 있으며 Fig. 4B는 Resource RPC column을 통과한 peak로서 molecular maker와 Rf(Relative mobility) 값을 비교하여 구한 분자량은 4,900 Da 으로 나타났다. 이것은 종자에서 발아 시에 다른 균의 침입을 막으려는 방편으로 존재하는 항균 peptide인 PAFP,<sup>15)</sup> Pa-AMP,<sup>16)</sup> Pa-AFP<sup>17)</sup> 등의 분자량이 4,000 Da인 것으로 미루어 뿌리에 존재하는 유사한 기능을 가진 peptide인 것으로 생각되며 PAMP-r(Pokeweed antimicrobial peptide from root)로 명명하였다.

**항균활성.** PAMP-r의 항균활성을 측정된 MTT assay의 결



**Fig. 5 . Effect of PAMP-r on the growth of *Bacillus subtilis*.**



**Fig. 6. Effect of PAMP-r on the growth of *Saccharomyces formonsis*.**

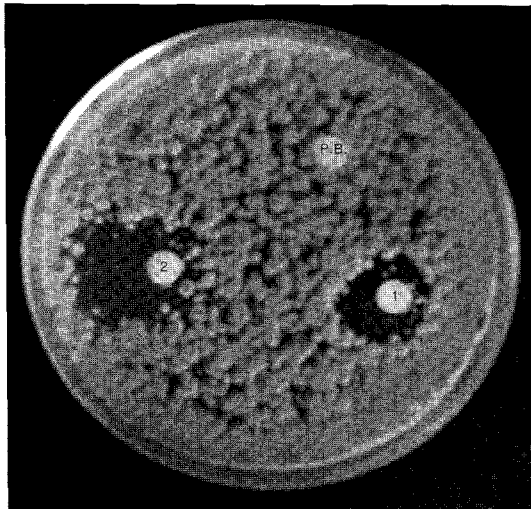
과를 Table 2에 나타내었다. PAMP-r에 민감한 반응을 보인 bacteria는 *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloacae*이었으며 *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pnunonia* 등 그람음성균에서도 상당한 활성을 나타냈다. 이것은 미국자리공의 종자에서 분리된 Pa-AMP의 경우와 비교했을 때 *Bacillus megaterium*과 *Staphyanococcus* sp.에서 매우 강한 활성을 나타낸 점은 유사하며, *Escherichia coli*에서는 IC<sub>50</sub> 결과가 300  $\mu$ g 이상으로 매우 낮은 활성을 나타내어 그람음성균에서는 활성을 갖지 않는 것으로 보고 된 것과는 대조를 이루었다.<sup>16)</sup> 이 점 이외에도 PAMP-r는 *Saccharomyces formonsis*, *Saccharomyces cerevisiae* 등 yeast에도 강한 생육저해 활성을 나타내었다.

그러나 같은 농도의 PAMP-r는 *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus faecalis* 12S001과 같은 젖산균들에 대한 성장저해효과는 거의 없었으며 4배 이상의 고 농도를 처리하였을 때 40%정도의 성장저해효과는 나타났다. 이와 같이 그람음성균, 그람양성균, 효모와 같은 광범위한 적용 범위와 균에 따른 다양한 저해정도는 PAMP-r의 농도를 적절히 조절함으로써 미생물의 선택적인 성장을 가능하게 하여 발효식품의 산패를 방지하는 천연방부제로서의 이용이 가능할 것이라 생각된다.

**성장저해 효과.** MTT assay를 통한 항균력 측정시 가장 민감한 반응을 보였던 *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces formonsi*에

**Table 3. 50% growth inhibition concentrations of PAMP-r from roots of pokeweed**

Species	IC <sub>50</sub> (ng/ml)
<i>Bacillus subtilis</i>	25.79
<i>Staphylococcus aureus</i>	34.17
<i>Enterobacter cloacae</i>	43.41
<i>Saccharomyces formonsis</i> Taiken	35.16

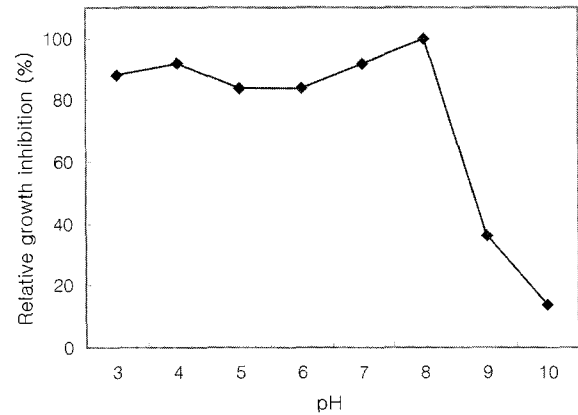


**Fig. 7. Growth inhibition of PAMP-r against *Trichoderma viride*.** Disk P.B. has 10 mM phosphate buffer, disk 1 has 6.7 µg, and disk 2 has 13.4 µg of PAMP-r.

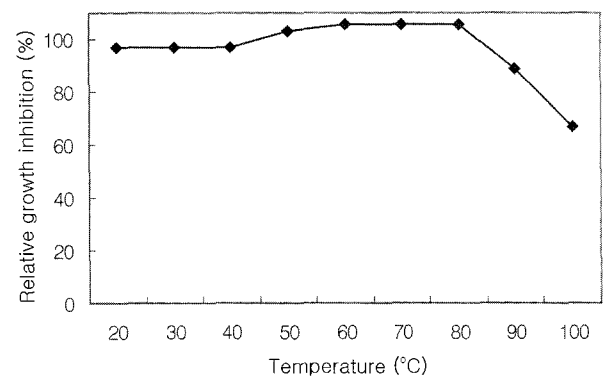
PAMP-r을 농도별로 첨가한 후 액체배지 속에서 균의 증식정도를 시간에 따라 측정한 결과를 Fig. 5과 Fig. 6에 나타내었다. 두 경우에서 모두 첨가된 PAMP-r의 농도가 높을수록 생장의 억제 현저히 나타났다. 41.9 ng의 PAMP-r을 기준으로 하여 더 적은 농도의 경우에는 대조군에 비하여 생장이 지연되는 경향을 보였으나 시간의 경과와 함께 결국 대조군과 유사한 흡광도를 보였다. 그러나 41.9 ng보다도 높은 농도의 PAMP-r이 첨가되었을 때에는 아무리 시간이 경과하여도 대조군과 같은 성장도는 보이지 않아 모두 사멸한 것으로 생각되었다. 41.9 ng이 첨가된 경우에는 *Bacillus subtilis*는 시간이 경과하여도 성장하지 않았지만 *Saccharomyces formonsis*는 4시간까지 점진적인 성장을 보인 후 더 이상의 증식은 없었다. 이 농도에서의 증식결과와 전체적인 성장곡선의 모습을 함께 이용하여 *Bacillus subtilis*와 *Saccharomyces formonsis*을 비교하면 *Bacillus subtilis*가 훨씬 민감한 반응을 보임을 알 수 있다. 이들간의 좀 더 정확한 민감도의 비교는 IC<sub>50</sub>의 측정으로 가능하다.

IC<sub>50</sub>(Concentration of 50% growth inhibition). *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces formonsis* 이외에 *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloacae*의 민감도를 IC<sub>50</sub> 즉 50% 성장저해시의 PAMP-r 농도로서 상호 비교하였을 때 Table 3에서처럼 *Bacillus subtilis* > *Staphylococcus aureus* > *Saccharomyces formonsis* > *Enterobacter cloacae*의 순서를 보이므로써 *Bacillus subtilis*가 PAMP-r에 가장 민감한 것으로 나타났다.

**항 곰팡이 활성.** 토양 유래 곰팡이인 *Trichoderma viride*의



**Fig. 8. Effect of pH on the stability of PAFP-r.**



**Fig. 9. Effect of temperature on the stability of PAFP-r.**

현탁액을 이용한 disc method에서 PAMP-r는 Fig. 7에서처럼 명확한 생장억제 고리를 보이므로써 bacteria와 효모 뿐만 아니라 곰팡이에도 활성이 있는 것으로 나타나 아주 광범위한 항균 활성 범위를 가지는 것으로 조사되었다. 이것은 종자에서 발견된 PAFP,<sup>15)</sup> Pa-AMP,<sup>16)</sup> Pa-AMP<sup>17)</sup>의 경우에서도 *Trichoderma viride*를 포함하는 *Alternaria panax*, *Fusarium* sp., *Rhizoctonia solani* 등 토양 유래의 곰팡이들과 식품의 산패에 관여하는 곰팡이들에 활성을 가지는 점과 동일한 결과이다. 앞에서 기술한 이들 간의 유사한 분자량 등으로 미루어 볼 때 PAMP-r는 뿌리에 있는 이들의 analogue인 것으로 추정된다. 이 점은 미국 자리공의 다양한 부위와 광범위한 미생물을 이용한 지속적인 연구와 연구결과의 체계적인 비교로써 규명될 수 있으리라 생각된다.

**감사의 글**

본 연구는 2003학년도 경성대학교 학술지원연구비에 의하여 수행 되었습니다.

**참고문헌**

1. Agrios, G. N. (1988) In *Plant Pathology*. Academic Press, Inc., New York, pp. 325-450.

2. Bowles, D. J. (1990) Defense-related proteins in higher plants. *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 873-907.
3. Schlumbaum, A., Mauch, F., Vogeli U. and Boller T. (1986) Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. *Nature* **324**, 365-367.
4. Kim, W. Y., Cheong, N. E., Jae, D. Y., Lee, D. C., Kim, J. W., Cho S. H. and Lee, S. Y. (1994) Characterization of antimicrobial chitinase purified from the grapefruit extract. *Korean J. Plant Pathol.* **10**, 277-283.
5. Arlorio, M., Ludwig, A., Boller T. and Bonfante P. (1992) Inhibition of fungal growth by plant chitinases and  $\beta$ -1, 3-glucanases a morphological study. *Protoplasma* **171**, 34-43.
6. Stirpe, F. and Barbieri, L. (1986) Ribosome-inactivating proteins up to date. *FEBS Lett.* **195**, 1-8.
7. Irvin, J. D. and Uckun, F. M. (1992) Pokeweed antiviral protein: Ribosome inactivation and therapeutic applications. *Pharmaco. Therapeut.* **55**, 279-302.
8. Tumer, N. E., Hudak, K., Di, R., Coetzer, C., Wang P. and Zourenko O. (1999) Pokeweed antiviral protein and its applications. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **240**, 139-158.
9. Bohlmann, H., Apel, K. and Garcia-Olmedo F. (1994) Thionins. *Plant Mol. Biol. Rep.* **12**, S75.
10. Broekaert, W. F., Cammue, B. P. A., De Bolle M. F. C., Thevissen, K., De Samblanx G. W. and Osborn R. W. (1997) Antimicrobial peptides from plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* **16**, 297-323.
11. Smith, G. P., Patel, S. U., Windass, J. D., Thornton, J. M., Winter G. and Griffiths, A. D. (1998) Small binding proteins selected from a combinatorial repertoire of knottins displayed on phage. *J. Mol. Biol.* **277**, 317-332.
12. Irvin, J. D. (1975) Purification and partial characterization of the antiviral protein from *Phytolacca americana* which inhibits eukaryotic protein synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **169**, 522-528.
13. Myers D. E., Jun, X., Clementson, D., Donelson, R., Sicheneder, A., Hoffman, N., Bell, K., Sarquis, M., Langlie, M. C., Turner N. and Uckun, F. M. (1997) Large scale manufacturing of TXU (anti-CD7)-pokeweed antiviral protein (PAP) immunoconjugate for clinical trials. *Leuk. Lymphoma* **27**, 275-302.
14. Kino M., Yamaguchi, K., Umekawa, H. and Funatsu, G. (1995) Purification and characterization of three mitogenic lectins from the roots of pokeweed (*Phytolacca americana*). *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**, 683-688.
15. Shao, F., Hu, Z., Xiong, Y. M., Huang, Q. Z., Wang, C. G., Zhu R. H. and Wang D. C. (1999) A new antifungal peptide from the seeds of *Phytolacca americana*: characterization, amino acid sequence and cDNA cloning. *BBA.* **1430**, 262-268.
16. Liu, Y., Luo, J., Xu, C., Ren, F., Peng, C., Wu, G. and Zhao, J. (2000) Purification, characterization, and molecular cloning of the gene of a seed-specific antimicrobial protein from pokeweed. *Plant Physiol.* **122**, 1015-1024.
17. Son, D. Y., Shin, B. C., Yun, D. J., Seong K. Y., and Chung, Y. R. (1998) Purification and characterization of an antifungal peptide from the seeds of *Phytolacca americana*. *Korean J. Plant Pathol.* **14**, 203-208.
18. Kim, J. H. (1998) Purification and characterization of lectins from a pokeweed (*Phytolacca Americana*). *Kyungshung Univ. Bull.* **19**, 603-613.
19. Leammli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
20. Hussain, R. F., Nouri A. M. E. and Oliver R. T. D. (1993) A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay. *J. Immunol. Methods* **160**, 89-96.
21. Sladowski, D., Steer, S. J., Clothier, R. H. and Balls M. (1993) An improved MTT assay. *J. Immunol. Methods* **157**, 203-207.
22. Mosmann, T., (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55-63.
23. Stevens, M. G., Kehrli, M. E. Jr. and Canning, P. C. (1991) A colorimetric assay for quantitating bovine neutrophil bactericidal activity. *Vet. Immunol. Immunop.* **28**, 45-56
24. Paik, I. K (1998) Rapid antibacterial sensitivity test by Tetrazolium salt MTT, M.D. Thesis, Chonnam Univ. Jeonju, Korea.

#### Purification and Characterization of Antimicrobial Peptide from Roots of Pokeweed

Jeong-Joo Kim, Hye-young Jang<sup>1</sup> and Jae-Ho Kim\* (Department of Biology, Kyungshung University, Busan 608-736, Korea; <sup>1</sup>Department of Biological Sciences, Kosin University, Busan 606-080, Korea)

**Abstract:** An antimicrobial peptide was purified from the roots of *Phytolacca americana* L. and was designated as PAMP-r. Purification was carried out by DEAE-cellulose anion exchange, sephadex G-75 gel filtration, Mono S cation exchange, and Resource RPC reverse phase chromatography. The molecular weight of PAMP-r was estimated to be about 4,900 Da by 15% SDS-PAGE under reducing condition. PAMP-r exhibited a broad spectrum of antimicrobial activity. PAMP-r was stable against heat and pH treatment; its activity was not diminished by the heat treatment up to 80°C for 30 min, and it showed a pH stability in the range between pH 3.0 to pH 8.0.

Key words: pokeweed, *Phytolacca americana* L., antimicrobial peptide

\*Corresponding author