

사람 장내세균에 의한 폰시린과 나린진의 대사

김동현# · 장일성 · 김남재* · 윤황금
경희대학교 약학대학, *경희대학교 동서의학연구소
(Received February 14, 1994)

Metabolism of Poncirin and Naringin by Human Intestinal Bacteria

Dong-Hyun, Kim#, Il-Sung, Jang, Nam-Jae, Kim* and Whang-Geum, Youn
College of Pharmacy and *East-West Medical Research Institute,
Kyunghee University, Seoul 130-701 Korea

Abstract—Poncirin and naringin which are the flavanone rhamnoglucoside showed anti-inflammatory activity as the major component of fruit of *Poncirus trifoliata*. Poncirin was metabolized by intestinal bacteria of human and rats. Among the human intestinal bacteria, *Bacteroides* JY-6 converted a poncirin to naringin, ponciretin- β -D-glucopyranoside, naringenin- β -D-glucopyranoside, naringenin and ponciretin and did a naringin to poncirin, ponciretin- β -D-glucopyranoside, naringenin- β -D-glucopyranoside, naringenin and ponciretin.

Keywords □ *Poncirus trifoliata*, poncirin, naringin, *Bacteroides* JY-6, intestinal bacteria.

경구투여되는 천연약리활성물질들은 소화관으로 들어오면 필연적으로 장내 상주하는 세균총과 접하게 되고 이 장내세균들은 약물의 대사에 관여하여 원화합물의 약효를 상실시키거나 약효를 발현시키기도 하며 경우에 따라서는 의약품의 약효를 증가시키는 경우도 있다.^{1,2)}

천연의 많은 flavonoid 화합물은 glucose, galactose, rhamnose 등을 가지고 있는 glycoside 형태로 존재하고 있으며 이러한 배당체 형태로는 위나 소장에서의 체내로 흡수되지 못하고 대부분이 장내세균의 가수분해를 받아 비당체로 전환된다.

Flavonoid 배당체의 비당체로의 가수분해에 대해서는 Plouvier가 rutin을 rhamnodiastase로 가수분해하여 quercetin과 rutinose를 생성함을 보고한 바 있으며,³⁾ Simpson 등과 Hay 등은 토양균인 *Aspergillus flavus*가 rutin을 quercetin과 rutinose로 가수분해하는 glycosidase를 생성하는 것을 밝혔으며,^{4,5)} MacDo-

nald 등은 사람의 장내세균총으로부터 β -glucosidase 활성을 가진 *Bacteroides fragilis*를 분리하였다.⁶⁾ 1987년, Bokkenheuser 등은 장내세균인 *Bacteroides* spp.으로부터 β -glucosidase, β -galactosidase, α -rhamnosidase 활성을 가진 균주들을 분리하여 rutin 및 robinin이 가수분해되는 것을 밝혔다.⁷⁾

저자 등은 rutin 및 hesperidin과 같은 rhamnoglucoside 중의 하나인 poncirin(5,7-dihydroxy-4'-methoxy flavanone 7-rhamnoglucoside)을 *Poncirus fructus*(枳實)로부터 단리하여 항염증 활성을 검색한 바 유의적인 항염증 효과가 있음을 보고하였으며,⁸⁾ 이러한 poncirin을 복강내로 투여하였을 때는 항염증 효과를 나타내지 못한 반면에 poncirin을 가수분해한 비당체를 복강내 투여했을 경우에는 항염증 효과를 나타냄을 알 수 있었다. poncirin은 혈액중의 효소에 의해 대사되지 않았으며 간의 효소계에 의해서도 대부분이 대사되지 않았으므로 poncirin이 비당체 및 기타 대사체로 전환되는 것은 혈액 및 간 효소 이외의 대사를 받을 것으로 생각되었다. 이미 flavonoid(gly-

#본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

coside)류의 생체내 대사에는 장내세균총이 관여하며 glycoside의 가수분해와 나아가서는 C환의 개열에 의한 대사체들이 생성되는 것이 밝혀진 것에 비추어 볼때 poncirin도 장내세균에 의해 대사를 받을 것으로 생각되어 사람의 장내세균총을 작용시킨 바 poncirin의 비당체가 생성되었고, 이 장내세균총에는 monoglycoside를 갖는 중간체를 경유하여 poncirin의 α -rhamnose 결합과 β -glucose 결합을 차례로 가수분해하는 균주와 직접 비당체로 전환시키는 경우가 있음을 밝혔다.⁹⁾

한편, Winter 등은 사람의 장내세균총으로부터 flavonoid의 C환의 개열을 일으키는 *Clostridium spp.* 균주들을 분리하여 *in vitro*에서 이 균주들에 의해 rutin이 3,4-dihydroxyphenylacetic acid(DHPAA)로 kaempferol 이 4-hydroxyphenyl acetic acid(HPAA)로, naringin이 phenylacetic acid(PPA)로 대사됨을 확인하였으나,¹⁰⁾ poncirin 등에 대해서는 알려져 있지 않다.

저자 등은 여기에서 항염증 작용을 갖고있는 poncirin과 naringin를 각각의 monoglycoside인 중간체를 경유하여 비당체로 전환시키는 균주를 분리하고 이들의 대사과정을 비교하였다.

실 험

시약—Poncirin과 ponciretin은 전보에서 분리한 것을 사용하였고⁸⁾ naringin 및 narigenin은 Sigma사로부터 구입하였다. General Anaerobic Media (GAM)은 日水製藥(일본)으로부터 구입했으며, 박층 크로마토그래피는 precoated TLC plate kieselgel 60F₂₅₄(Merk Art. 5714)를 preparative TLC(전개용매, CHCl₃/MeOH/H₂O=80/20/1; 발색시약, 10% 바니린 황산)는 TLC plate 60F₂₅₄(Merk Art. 13895)를 사용했다.

장내세균총에 의한 poncirin 및 naringin의 대사—건강한 사람(20대 남자)의 분을 채취하여 즉시 10배의 GAM broth에 현탁시켜서 현탁액 0.5 ml에 poncirin 또는 naringin를 1 mg/ml 용액 0.5 ml을 가한 후 37 °C에서 배양시켰다. 24시간 배양 후 EtOAc로 추출하여 TLC(전개용매, CHCl₃/MeOH/H₂O=80/20/1; 발색시약, 10% 바니린황산)를 행했다.

Poncirin 및 naringin을 대사시키는 장내세균의 분리—앞에서 조제한 사람의 장내세균총 현탁액을 GAM broth로 10⁴, 10⁵, 10⁶배 희석하여 각각 GAM agar평판배지에 도말하여 Steel wool법에 따라 혐기적으로 배양시켰다. 48시간 배양후 각 평판배지로부터 100여종의 colony를 골라 5 ml GAM broth에 이식하여 24시간 배양하여 poncirin 및 naringin 대사를 검색하였다. 균 배양액을 6,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 얻은 균체를 20 mM 인산완충액(pH 7.0) 2 ml을 가하여 1분씩 2회 초음파처리(Heat System, U.S.A.)한 후 1 ml을 취하여 poncirin 또는 naringin 1 mg/ml 용액 1 ml과 혼합하여 37°C에서 24시간 동안 배양하면서 6시간마다 EtOAc로 추출하여 TLC(전개용매, CHCl₃/MeOH/H₂O=80/20/1; 발색시약, 10% 바니린황산)를 행하였다.

장내세균(JY-6)에 의한 poncirin 및 naringin 대사체의 분리—poncirin 및 naringin 대사능을 가진 것으로 검색된 JY-6 균주를 GAM broth 100 ml에 배양한 후 원심분리하여 얻은 균체를 10 ml 인산완충액에 현탁하여 초음파처리하고 여기에 poncirin 또는 naringin를 0.5 mg/ml 100 ml을 가하여 37°C에서 진탕하면서 배양하였다. 12시간 마다 경시적으로 반응액의 25 ml를 취하여 EtOAc로 추출하고 감압농축한 후 Preparative TLC를 행하여 대사체를 분리 하였다. **균주의 동정**—Bergey's manual에 따라 동정하였다.¹¹⁾

결 과

장내세균총에 의한 poncirin 및 naringin의 대사—사람의 장내세균총과 poncirin 또는 naringin을 반응시킨 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 24시간 반응후에 poncirin 또는 naringin의 대부분이 비당체로 가수분해 되었음을 확인하였다.

Poncirin 및 naringin 대사능을 가진 장내세균의 분리—장내세균총으로부터 분리한 100개의 균주들과 poncirin 및 naringin을 반응시킨 결과 poncirin의 경우에는 7개의 균주가 naringin의 경우는 12개가 비당체로 대사시켰으며, poncirin을 대사시키는 균주는 모두 naringin을 대사시켰다. 이때 대사체는 적어도

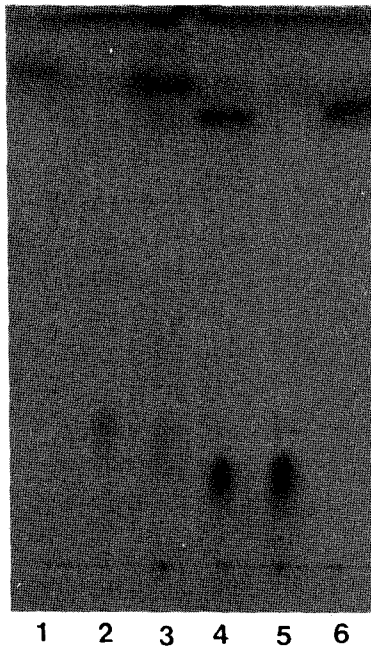


Fig. 1—TLC chromatogram of metabolites of poncirin and naringin by human intestinal microflora. 1, ponciretin; 2, poncirin; 3, metabolites of poncirin; 4, metabolites of naringin; 5, naringin; 6, naringenin.

poncirin과 naringin 모두 그화합물의 배당체와 Rf치가 다른 새로운 대사체를 생성한 것을 TLC상에서 확인하였고 그 중에서 중간체를 형성하는 대사능이 우수한 균주를 JY-6 균주라 명하였다.

균주의 동정—JY-6균주(Fig. 2)의 일반적인 특징을 조사한 결과 Table I과 같았다. JY-6균주는 그람음성 간균으로 β -glucosidase와 α -rhamnosidase의 효소활성을 갖고있으며, H_2S 을 생성하지 않으며, 그외의 반응에는 음성이었다.

JY-6 균주에 의한 poncirin 대사 및 대사체의 분리—Poncirin에 JY-6 균주를 작용시켜 경시적으로 대사체 생성을 조사한 결과 약 18시간 반응후에 1차 대사체 a, b, c, d가 발견되었으며 그 후부터 비당체보다 약간 낮은 Rf치를 갖는 대사체 e와 비당체와 같은 Rf치를 가진 대사체 f가 생성되었다. Preparative TLC를 행하여 분리한 대사체를 poncirin 및 그 비당체 표준과 비교한 TLC chromatogram을 Fig. 3에 나타내었다. Poncirin 표준의 Rf치는 0.21, 비당체 표

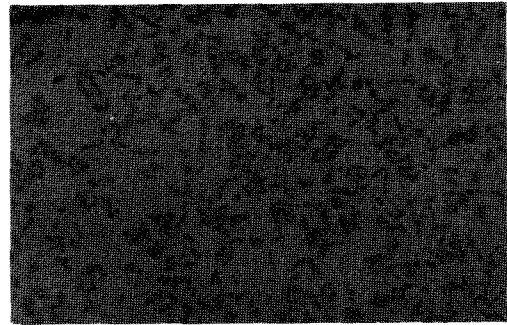


Fig. 2—The micrograph of Bacteroides JY-6 with gram staining($\times 1000$).

Table I—Characteristics of JY-6 isolated from human intestinal bacteria

	JY-6	B. distasonis ¹¹⁾	B. multiacidus ¹¹⁾
colony diameter	<0.5 mm	<0.5 mm	<0.5 mm
gram stain	—	—	—
shape	rod	rod	rod
MR test	—	—	—
VP test	—	—	—
nitrate reduction	—	—	+
Simmon's citrate	—	—	—
H_2S production	—	—	+/-
indole production	—	—	—
β -glucosidase	+	*	*
α -rhamnosidase	+	*	*
urease	—	—	—

*, not determined.

표는 0.75인데 비하여 대사체 a, b, c, d, e, f의 Rf치는 각각 0.11, 0.21, 0.34, 0.48, 0.70, 0.75 이었고, 대사체 a, b, c, d는 Mg-HCl 반응과 Molish 반응에 양성을 나타내 당이 결합된 flavonoid 화합물임을 알 수 있었다. 이 대사체들에 대하여 KOH로 가수분해 후 EtOAc 추출하여 TLC를 행한 결과 a와 c는 naringenin과 동일한 Rf치인 0.70였으며, b와 d는 ponciretin과 동일한 0.75의 Rf치를 나타냈다. 수층에 대하여 중화하고 동결건조하여 TLC를 이용하여 당을 분석한 결과 a와 b는 L-rhamnose와 D-glucose가 있는 반면에 c와 d는 D-glucose만을 함유하고 있었다(Fig. 4, Fig. 5). 대사체 a, b, c, d의 가수분해물에 대하여 GC-MS(Hewlett Packard 5890A, MSD-5970) 분석에 의해 a와 c는 naringenin과 동일한 MS-spectrum을 보였고

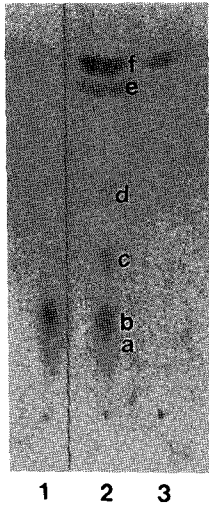


Fig. 3—TLC chromatogram of metabolites of poncirin by human intestinal bacterium, *Bacteroides* JY-6.
1, poncirin; 2, metabolites of poncirin; 3, ponciretin.

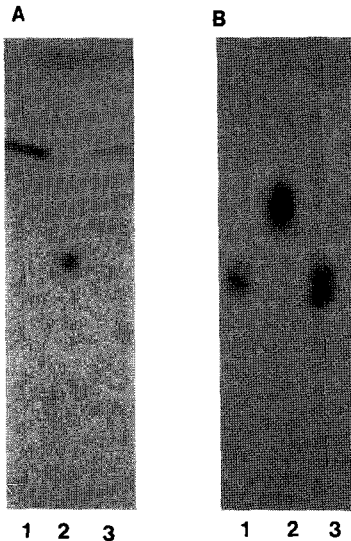


Fig. 4—TLC chromatogram of metabolite c hydrolyzed with KOH.
A: Ethylacetate fraction of metabolite c hydrolyzed with KOH. 1, hydrolyzed metabolite c; 2, metabolite c; 3, ponciretin.
B: Water layer of metabolite c hydrolyzed with KOH.
1, hydrolyzed metabolite c; 2, L-Rhamnose; 3, D-Glucose.

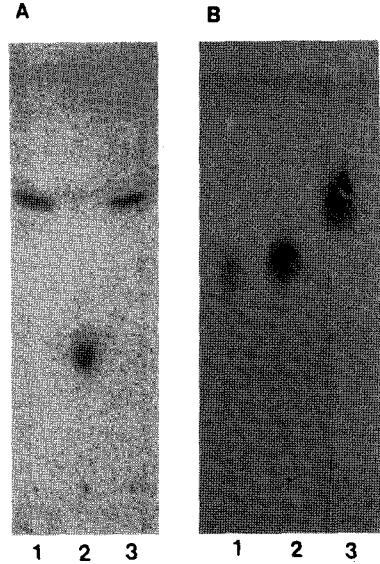


Fig. 5—TLC chromatogram of metabolite d hydrolyzed with KOH.
A: Ethylacetate fraction of metabolite d hydrolyzed with KOH. 1, hydrolyzed metabolite d; 2, metabolite d; 3, naringenin.
B: Water layer of metabolite d hydrolyzed with KOH.
1, hydrolyzed metabolite d; 2, D-Glucose; 3, L-Rhamnose.

분자량도 같게 나타나 naringenin과 같은 물질임을 확인하였다. 즉, a는 naringin, b는 poncirin, c는 naringenin- β -D-glucopyranoside, d는 ponciretin- β -D-glucopyranoside, e는 naringenin, f는 ponciretin으로 대사 됨을 알 수 있었다.

JY-6 균주에 의한 naringin의 대사 및 대사체의 분리—Naringin에 JY-6 균주를 작용시켜 경시적으로 대사체 생성을 관찰한 바 약 18시간 반응후에 1차 대사체 a, b, c, d가 발견되었으며 그 후부터 비당체와 같은 Rf치를 갖는 대사체 e와 이것보다 약간 높은 Rf치를 갖는 대사체 f가 생성되었다. Preparative TLC를 행하여 분리한 대사체를 naringin표품, naringenin과 비교한 TLC chromatogram을 Fig. 6에 나타내었다. Naringin 표품의 Rf치는 0.11, 비당체 표품은 0.70인데 비하여 대사체 a, b, c, d, e, f의 Rf치는 각각 0.11, 0.21, 0.34, 0.48, 0.70, 0.75이었고, 대사체 a, b, c, d는 Mg-HCl 반응과 Molish 반응에 양성을

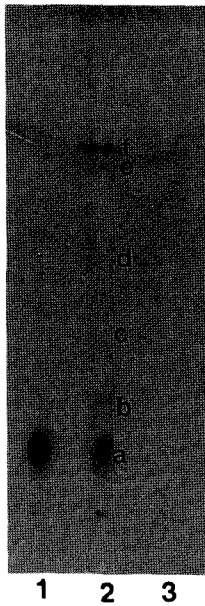


Fig. 6—TLC chromatogram of metabolites of naringin by human intestinal bacterium, *Bacteroides* JY-6.

1, naringin; 2, metabolites of naringin; 3, naringenin.

나타내 당이 결합된 flavonoid 화합물임을 알 수 있었다. 이 대사체들에 대하여 KOH로 가수분해 후 EtOAc 추출하여 TLC를 행한 결과 a와 c는 naringenin과 동일한 Rf치였으며, b와 d는 ponciretin과 동일한 Rf치를 나타냈다. 수층에 대하여 중화하고 동결건조하여 TLC를 이용하여 당을 분석한 결과 Fig. 4와 Fig. 5에서와 같이 a와 b는 L-rhamnose와 D-glucose가 있는 반면에 c와 d는 D-glucose만을 함유하고 있었다. 대사체 a, b, c, d의 가수분해물에 대하여 GC-MS 분석에 의해 b와 d는 ponciretin과 동일한 MS-spectrum을 보였고 분자량도 같게 나타나 ponciretin과 같은 물질임을 확인하였다. 즉, a는 naringin, b는 poncirin, c는 naringenin- β -D-glucopyranoside, d는 ponciretin- β -D-glucopyranoside, e는 naringenin, f는 ponciretin으로 대사 됨을 알 수 있었다.

JY-6 균주에 의한 ponciretin 및 naringenin의 대사체—Poncirin의 대사체인 ponciretin을 JY-6균주로 대사시킨 결과 ponciretin보다 Rf치가 낮은 대사체가 생성되었고, 이 대사체는 TLC 및 GC-MS를 분석한

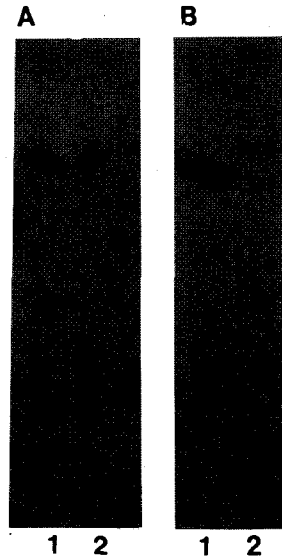


Fig. 7—Metabolism of ponciretin and naringenin by JY-6.

(A) 1, metabolite of ponciretin; 2, ponciretin.
(B) 1, metabolite of naringenin; 2, naringenin.

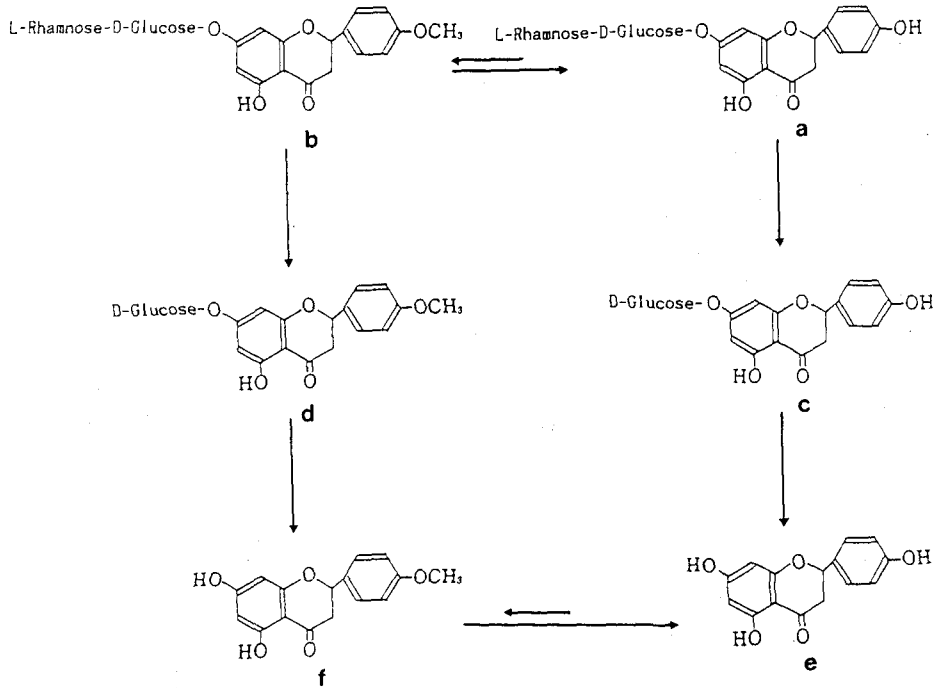
결과 naringenin이었다. Naringenin의 대사체인 Naringenin을 대사시킨 결과 poncirin의 대사체인 ponciretin이 아주 적은 양이나마 생성됨을 관찰할 수 있었다 (Fig. 7). 이러한 결과는 JY-6균주에 의해 ponciretin은 naringenin으로 naringenin은 ponciretin으로 대사됨은 사람의 장내에서도 같은 양식의 반응이 일어날 수 있을 것으로 사료된다.

고찰 및 결론

사람의 장내세균으로부터 분리한 균주는 사람의 장내에서 우세균인 *Bacteroides* 균주였으며 *Bacteroides distasonis* 균주 또는 *B. multiacidus*와 유사한 특성을 갖고 있는 균주였다.

Poncirin은 한국사람의 장내 우세미생물인 *Bacteroides* JY-6에 의해 a는 naringin, b는 poncirin, c는 naringenin- β -D-glucopyranoside, d는 ponciretin- β -D-glucopyranoside, e는 naringenin, f는 ponciretin으로 대사 됨을 알 수 있었다.

Naringin 역시 같은 대사체를 생성함을 알 수 있었다. 그외에도 여기에는 결과를 나타내지 않았지만 ponciretin- β -D-glucopyranoside를 JY-6 균주로 대사



Scheme I—Metabolic pathway of poncirin and naringin by *Bacteroides* JY-6.

시킨 결과 poncirtin과 naringenin를 생성하며, naringenin-β-D-glucopyranoside를 가지고 대사를 시키면 naringenin과 poncirtin를 생성함을 확인 할 수 있었다. 또 poncirtin를 대사를 시키면 naringenin를 생성하며, naringenin를 가지고 대사를 시키면 poncirtin를 생성함을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로 미루어보면 poncirin과 naringin은 Scheme I과 같은 경로로 대사 될 것으로 사료된다.

한편, flavonoid들이 항돌연변이 효과가 있다는 것은 잘 알려져 있다.¹²⁾ 여기에서는 나타내지 않았지만 Ames test결과 이 대사체들도 1-nitropyrene에 대한 항돌연변이 효과가 우수하였으며, 그 효과는 poncirin > naringin > poncirtin > poncirtin-β-D-glucopyranoside > naringenin-β-D-glucopyranoside > naringenin 순이었다.

Flavonoid가 대부분 장내미생물에 의해 대사된다는 점을 감안한다면 대사체들에 대해서도 생리활성을 조사해볼 필요가 있다고 생각된다.

문 헌

1) Drasar, B. S. and Hill, M. J. Human intestinal flora

54-171 (1974) Academic Press (New York)

2) Dong-Hyun Kim and Sang-bum Shim: Human intestinal flora related to metabolism of drugs, *Bull K.H. Pharm. Sci.*, **19**, 145 (1990).
 3) Victor Plouvier: The presence of rutinoid in the flower of certain Magnolia, *Compt. rend.*, **216**, 459 (1943). [C. A., **38**, 4010₂]
 4) Simpson, F. J., Talbot, G. and Westlake, D. W. S.: Production of carbon monoxide in the enzymic degradation of rutin, *Biochem. Biophys. Research Commun.*, **2**, 15 (1960).
 5) Hay, G. W., Westlake, D. W. S. and Simpson, F. J.: Degradation of rutin by *Aspergillus flavus* and characterization of rutinose, *Can. J. Microbiol.*, **7**, 921 (1961).
 6) McDonald, I. A., Mader, J. A. & Bussard, R. G.: The role of rutin and quercitrin in stimulating flavonol glycosidase activity by cultured cell-free microbial preparations of human feces and saliva, *Mutat. Res.*, **122**, 95 (1983).
 7) Bokkenheuser, V. D., Shackleton, H. L. and Winter, J.: Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by

- strains of intestinal Bacteroides from humans, *Biochem. J.*, **248**, 953 (1987).
- 8) Yoon, W.-G., Kim, D.-H., Kim, N.-J. and Hong, N.-D.: Studies on pharmacological actions of fruit of *Poncirus trifoliata*. *Yakhakhoeji* **36**, 548 (1992).
- 9) Yoon, W.-G., Hyun, S.-H., Kim, D.-H., Kim, N.-J. and Hong, N.-D.: Metabolism of poncirin by intestinal bacteria *Yakhakhoeji* **37**, 262 (1993).
- 10) Winter, J., Moore, L. H., Dowell, V. R. and Bokke-
nheuser, V. D.: C-ring Cleavage of Flavonoids by Human Intestinal Bacteria.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 1203 (1989).
- 11) Kreig, N. R. and Holt, J. G.: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, *Williams and Wilkins*, 1032 (1984-1989).
- 12) 千葉英雄: 食品の生體調節機能 學會出版 センター 309-318 (1992).