

Review

미생물 모방대사를 이용한 천연물의 생물전환

고학룡¹ · 안순철^{2*}¹바이오21 센터²부산대학교 의학전문대학원 미생물학 및 면역학 교실

Microbial Mimic Metabolism of Natural Products. Hack-Ryong Ko¹ and Soon-Cheol Ahn². ¹Bio21 Center, 1033 Moonsan, Jinju 660-844, Korea, ²Department of Microbiology and Immunology, Pusan National University School of Medicine, Busan 602-739, Korea

Abstract This aims to review natural products transformed by mimic intestinal metabolisms with microorganisms and hydrolytic enzymes, which exhibit enforced biological activity, higher extraction yield and identification of active components. In the process, transformation to the smaller active compounds with enzymes and microbes mimics the pharmacological action of natural products by intestinal bacteria. In order to establish conditions for the fermentation and enzyme reaction, it is required to choose several natural products for biotransformation and investigate the optimal conditions for the fermentation or the enzyme reaction such as composition, temperature, pH, inoculum, and cultivation time. It is expected an increase of the internal absorption of the active materials without regard to the intestinal microbes or its ability through biosynthesis of the active materials by the microbes and enzymes. And this techniques can be applied to biotransformation of natural products such as sesaminol, resveratrol, 1-deoxy nojirimycin, naringenin, quercetin, and baicalin and to the metabolism study using the animal model.

Key words : Mimic metabolism, biotransformation, natural products, intestinal microbes

천연물 유래 의약품

고도산업 사회로의 발전과 소득수준의 향상에 따른 식생활의 서구화와 보건의료의 확대에 의한 수명의 연장으로 야기되는 암, 고혈압, 면역관련 질환이 증가하면서 이러한 질환에 대해 치료보다는 예방적 개념이 도입되어 전통적으로 안정하게 사용되어 온 천연물(natural products) 혹은 천연물 유래 의약품이 21세기 바이오산업의 핵심으로 부각될 전망이다. 천연물 의약품은 오랜 임상적 실험을 통해서 인체에서의 약효가 입증되었고 부작용이 적어 장기간 복용이 가능하며 합성 의약품 개발에 비해 상대적으로 개발 성공률이 높고 비용이 적게 소요되는 장점이 있어서 천연물을 새로운 의약품 개발을 위한 연구 대상으로 삼고 있다.

천연물은 미생물, 유기합성과 더불어 다양한 생리 활성물질의 원천으로서 전체 생리활성물질의 약 1/3을 차지하고 있다. 1980년대 중반까지는 합성 기술을 비롯한 화학분야가 발달하여 대부분의 신규 의약품이 화학합성을 통해 이루어졌으나, 그 이후 개발된 신규개발 의약품 중 약 60%가 천연물을 기원으로 하고 있다. 현재 시판되고 있는 의약품의 약 39%가 천연물 혹은 천연물 유래로서 [2] 세계 100개 주요 의약품 중 17%를 차지하여 약 289억 불이 판매되었고(Fig. 1), 대부분은 항생체로서 매년 평균 10% 이상의 성장률을 보이고 있다. 따라서 미국, 유럽, 일본 등에서는 식물, 미생물 등 천연 생물자원의 탐색, 새로운 작용기전을 갖는 성분물질의 분리, 새로운 화합구조를 갖는 활성 물질의 도출 등에 많은 관심이 집중되고 있다.

* Corresponding author

Phone: +82-51-240-7735, Fax: +82-51-243-2259

E-mail: ahnsc@pusan.ac.kr

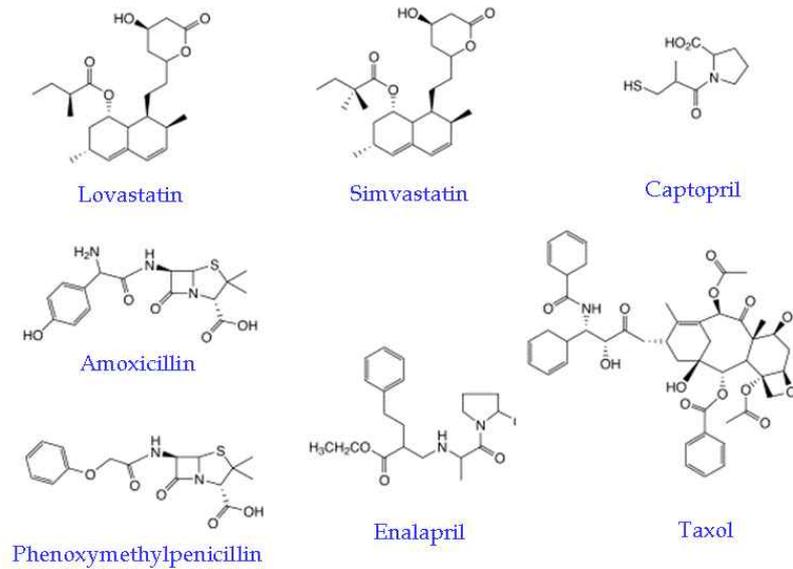


Fig. 1. Current best-selling drugs from natural products.

일반적인 생리활성물질 탐색원으로는 세균, 곰팡이, 조류 등의 미생물, 한약재, 야생화 등의 식물, 유기합성, 조합화학 등의 화학합성물이 있으며 경쟁적으로 새로운 생리활성물질이 발견, 보고되고 있다. 자동화 기계(systems robots) 및 고효율 탐색기술 (high throughput screening system, HTS)은 조합화학, 합성화학, 천연물 등의 화합물은행을 대상으로 표적 기반(target-based) 탐색을 할 수 있도록 지원되고 있으며 새로운 의약품의 개발을 위해서는 탐색원의 양과 구조의 다양성, 분석 systems의 감도 뿐 만 아니라 새로운 생물학적 검색계의 적용이 뒤 따라야 한다. 현재까지 지구상에는 250,000 종의 식물이 존재하지만 지금까지 탐색된 식물소재는 약 10% 만을 대상으로 해 왔고, 미생물의 경우 1% 미만을 탐색 대상으로 삼아 왔다. 또한 새로운 생리활성물질의 발견 빈도가 점차 감소하여 현재에는 0.1-0.01% 수준이고 천연물 유래 화합물의 약 40%는 합성 화합물에는 없는 구조로 알려져 새로운 천연물자원으로부터 생리활성물질을 탐색하고 자 시도되고 있다(Table 1).

합성 의약품과 비교했을 때 천연물 유래 의약품 개발의 장점으로는 구조적, 생물학적 효능의 다양성, 표적단백질과의 상호작용에 의한 약리활성, 다양한 생리활성, 새로운 탐색법에 의한 새로운 생리활성물질의 발견, 새로운 생리활성 기작의 발견, 분자생물학, 화학 분야에 대한 생화학적 수단, 합성화

합물을 위한 선도물질(lead compounds) 등을 들 수 있다 [9]. 천연물 의약품 개발은 최소의 투자로 최대의 성과를 얻을 수 있는 분야로, 1개의 새로운 의약품 개발을 통해 연간 1~2조 원의 매출과 매출액의 20~50%에 해당하는 순이익의 창출이 가능하다. 합성의약품 개발에 비해 개발 연구비의 4%로서 기업의 투자규모가 적고, 연구기간은 최소 50%에 해당하여 개발기간이 보다 단축될 수 있으므로, 새로운 의약품의 부가가치가 매우 높다. 국내의 경우, 광동제약의 간염치료제인 편자환, 유한양행의 골절치료제 유한골절산, 동아제약의 급만성 위염치료제 스티렌캡셀, SK제약의 관절염치료제 조인스정 등 10여 건의 천연물 의약품이 상품화 되었으며 그 외 다수의 기업에서 개발된 천연물들이 임상 단계에 들어가 새로운 천연물 의약품의 제품화에 박차를 가하고 있는 실정이다.

천연물의 체내 대사

천연물을 사람에게 사용하기 전에 천연물의 효과와 안정성에 관한 광범위한 연구가 선행되어 천연물이 체내에서 어떻게 대사, 변화되는지를 검토하여야 한다. 인체내에서 일어나는 천연물의 대사는 해독과정으로서 효소 시스템에 의한 천연물의 구조적 변형을 말하는 것으로, 천연물이 일련의 효소에 의해 연

Table 1. Strategies available for bioactive agents

Strategy	Proponents	Advantages	Disadvantages
Untapped geographical sources	Drug Discovery	Plant-based diversity has been historically successful	Concerns over sustainability of natural collecting
Preparation of libraries of isolated compounds	Analyticon Molecular Nature	More compatible than mixture for HTS	Cost of production
Marine sources	PharmaMar Australian Institute for Marine Sciences	Unusual chemistry	Identification of source organisms Recollection difficult on large scale
Insects	INBio CSIRO (Entomology)	Little studied	Scale-up potentially difficult
Plant tissue culture	Phytera	Control over genetic pathways	Concerns over access to genetic material sourced from developing countries
Combinatorial genetics	Kosan Biosciences Galilaeus Oy Terragen	Convenient production using femtor technology	Restricted range of structures

속적으로 생물전환이 일어난다. 일반적으로 극성이 높은 화합물로 대사가 일어나 혈액과 소변에 섞여 체외로 재빨리 제거가 된다. 천연물의 대사 연구는 인체내에서 대사산물을 예상하여 쥐, 개, 고양이, guinea pig, 토끼 등의 소동물이나, 관류 기관, 세포배양 및 효소 시스템을 이용하여 수행되었다. 그러나 실험동물에 소요되는 막대한 비용, 동물 처리에 의한 윤리적 문제, 천연물의 독성으로 인한 처리 양의 제한과 미량의 대사산물의 분석 등이 문제점으로 부각되고 있다. 또한 분석기술의 발전에도 불구하고 대사물질이 stereoisomer 화합물의 경우, 미량의 대사산물의 분리 및 구조 동정에도 어려움이 많다.

천연물은 생체내에서 대사되어 독성을 나타내거나 치료 효과를 나타내는 화합물로 전환되므로 새로운 의약품을 개발 하는데 천연물 대사에 대한 이해가 매우 중요하다. 자연적으로 존재하지 않은 화합물이나 천연물도 일반적인 효소에 의해 대사과정이

일어나 천연물의 구조에 따라 독성이나 치료 효과가 있는 대사산물을 형성한다. 간장, 신장 등에서 친수성의 극성물질로 생물 전환이 일어나 대사산물이 체내로부터 배출되는데 이때 Phase I(functionalization)과 Phase II(conjugation)으로 분류되는 두 종류의 대사반응이 일어난다 (Table 2, 3).

Phase I 반응은 산화, 환원과 가수분해반응을 포함하는 것으로, esterases, dehydrogenase, hydase, monoxygenases 등이 관여하며 lucanthone 이 hycanthone 로, compactin sodium이 pravastatin sodium으로 가수분해되거나 paclitaxel이 6a-hydroxy paclitaxel이나 3'-para hydroxy paclitaxel로 변화하거나 ellipticine이 7-hydroxy ellipticine이나 9-hydroxy ellipticine으로 대사되어 생리활성이 높아진다. Phase II 반응은 conjugation된 천연물이나 Phase I 대사산물에 glucuronic acid, glycine, acetate, methyl group, inorganic acid와 같은 내인성 물질이 합성되는 반응으로 대사산물의

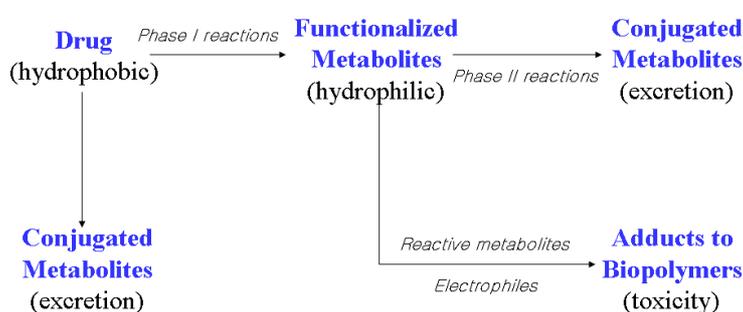
**Fig. 2.** Metabolic transformation of a drug in mammalian.

Table 2. Biotransformation of natural products by Phase I reaction

Phase I reaction	Substrates	Enzymes involved	Products
- Hydrolysis	Alcohol and phenol esters Amides Epoxides	Esterases Amidases Epoxide hydrases	Alcohols or phenols Amines Diols
- Reduction	Ketones Olefins Nitro and Azo compounds	Reductases Hydrogenases Nitro and Azo reductases	Alcohols Saturated compounds Nitroso, hydroxylamino and amino compounds
- Oxidation, hydroxylation	Aromatic, allylic, benzylic or unactivated carbon atoms		Phenols Alcohols
Epoxidation	Aromatic, allylic, double bonds		Epoxides
<i>N</i> -, <i>O</i> -, <i>S</i> -dealkylation	Aromatic or aliphatic derivatives	Cytochrome p450 Flavine Monooxygenases	Amino, hydroxy or thiol compounds <i>N</i> -oxides
<i>N</i> -, <i>S</i> -oxidation	Secondary and tertiary amines <i>S</i> -alkyl derivatives		Sulfoxides, sulfones
<i>N</i> -hydroxylation	Secondary and tertiary amines		Hydroxylamines
- Oxidative deamination	Primary amines	Monoamine oxidases	Aldehydes

Table 3. Biotransformation of natural products by Phase II reaction

Phase II reaction	Substrates	Enzymes involved	Products
- Glucuronidation	Alcohols or phenols Carboxylic acids Amines Thiols	Glucuronyltransferases (UDP-glucuronic acid)	α -or β -Glucuronides
- Glucosylation	Alcohol or phenols Carboxylic acids Amines Thiols	Glucosyltransferases (UDP-glucose)	α -or β -Glucosides
- Thiol conjugation	Epoxides	Glutathione-S-transferases (glutathione or <i>N</i> -acetylcysteine)	Glutathione or <i>N</i> -acetyl cysteine thioethers
- Glycine conjugation	Carboxylic acids	Acyl-CoA:amino acid <i>N</i> -transferase	Glycinamide conjugates
- Carbamoylation	Alcohols		<i>O</i> -carbamoyl derivatives
- Acetylation	Primary amines Hydrazines	Acetyltransferases (Acetyl CoA)	<i>N</i> -acetylated derivatives
- <i>O</i> -methylation	Phenols	Methyltransferases (S-adenosylmethionine)	Methyl arylethers
- Sulfatation	Alcohols of phenols Amines	Sulfotransferases (PAPS)	Sulfate esters Sulfonamides

친수성이 증가되어 대사산물이 신장에서 배출되게 한다. 흡수된 유효성분은 체내의 대사과정 중 phase I reaction에 의한 conjugation이나 phase II reaction에

의한 functional modification과 같은 화학적 변화를 통해 약독화되어 원래 가지고 있던 생리활성이 소실 되거나, 오히려 활성형으로 전환되어 체내에서 생리

활성(약효)이 증가되기도 한다 [14].

천연물의 소화 · 흡수

천연물에는 유익한 생리활성 성분들이 다량 함유되어 있으며, 그들 중 일부는 생리활성물질과 당이 결합된 배당체로 존재하며 배당체를 구성하는 당으로는 glucose, arabinose, galactose, rhamnose, xylose 등이 있으며 대부분 활성물질과 β -glycoside 결합을 하고 있다. 이와 같은 성분들은 소장이나 대장에서 서식하는 미생물들이 분비하는 다양한 가수분해 효소들에 의해 분해되고 체내로 흡수되지만, 분해되지 않은 성분들은 흡수되지 못하고 체외로 배출된다. 예를 들면, 감귤의 껍질 부분에 다량으로 함유되어 있는 flavanone 화합물인 naringenin과 hesperitin은 이의 배당체 형태인 naringin과 hesperidin 보다 항산화, 소염, 항암 활성 등의 우수한 활성을 나타내는 것으로 알려져 있으나 배당체 형태의 활성물질을 함유한 감귤을 섭취하는 경우, 이들을 분해할 수 있는 장내 미생물이나 체내 효소가 존재하지 않으면 체내로의 흡수율이 떨어져 대부분 체외로 배출되어 생리활성을 나타내기 어렵다. Flavonoid와 isoflavonoid 배당체는 소장에서 흡수되는 가장 일반적인 phenol류 화합물로서 배당체가 보통 b-결합을 하고 있으며 flavonol 화합물에서는 3-O-glycoside나 양파에서처럼 7번 4'번 위치에 당결합을 하고 있다. 또한 flavones, flavanones, isoflavones 화합물의 경우, 주로 7번 위치에 당결합을 하고 있다. 이러한 배당체는 조리과정에서는 거의 변형이 되지 않지만 발효나 자가분해과정을 통해 유리되며, 일반적으로 음식물이 흡수되었을 때 배당체에 비해 무배당체의 수준이 더 낮다. 최근의 연구결과들은 배당체는 소장에서 흡수될 수 없으며 b-당 결합은 대장에서 미생물에 의해 접촉되지 않고서는 분해되지 않는다고 하였다. 생리활성은 배당체의 존재에 따라 좌우되며, 배당체의 종류, 결합 위치에 따라 소장에서의 흡수율이 좌우된다. 주로 무배당체가 배당체에 비해 섭취 후, 혈액으로의 흡수나 생리활성 면에서 더 효과적이다. 그래서 소장에 존재하는 b-glucosidase 활성에 의한 deglycosylation 과정이 식이 flavonoid 배당체의 흡수 및 대사 과정에 중요한 것으로 알려졌다. 인체에서는 glucocerebrosidase, lactase phlorizin hydrolase와 broad-spe-

cific enzyme 등의 세 가지 b-glucosidases가 동정되었으며 broad-specific enzyme은 간, 신장, 소장에 존재하며 흡수, 대사, 배출, 생리활성에 관여하는 것으로 알려졌다.

미생물을 이용한 대사작용 연구

미생물에 의한 전환 연구는 steroid, alkaloids, antibiotics 분야에서 오랫동안 수행되어져 왔다. 포유류와 같은 진핵생물인 곰팡이의 가수분해 능력과 환원 능력은 오랫동안 잘 알려져 가장 일반적으로 이용되어 왔다. 원핵생물인 세균의 경우 곰팡이와 매우 비슷한 효소계를 가지고 있는 방선균(*Streptomyces*, *Nocardia*, *Actinoplanes*, *Mycobacteria*, *Corynebacterium sp.*)이나 탄소원이나 질소원으로 외인성물질(xenobiotics)을 사용하는 *Pseudomonas*속이 생물전환에 이용되어 왔으며 미세조류(microalgae)의 이용도 보고되었다. 산화반응의 경우, steroid의 11 α 나 11 β 위치에 대한 미생물의 수산화 반응은 포유류에서 일어나는 수산화 반응과 일치하며, 곰팡이류의 monooxygenase 효소계는 포유류 간의 monooxygenase와 비슷한 작용기작을 보여준다. 다양한 유기화합물에 대한 미생물의 수산화 반응의 체계적인 연구를 통해 포유류에서 일어나는 천연물의 Phase I 전환 반응의 대부분을 미생물의 생물전환계가 모방할 수 있는 것으로 밝혀졌다.

미생물을 사용한 대사작용에 대한 모델이 포유류의 대사과정을 모방하거나 천연물로부터 파생된 대사산물에 대한 정보를 줄 수 있다면 미생물 모델이 동물모델의 대체 모델로 사용 가능할 것이다. 1970년도 중반, Smith와 Rosazza에 의해 Microbial Models of Mammalian Metabolism이 제안되어 1980년 중반 기부터는 포유류의 천연물대사 연구를 위해 미생물이 많이 이용되고 있다. 미생물을 이용한 대사작용 연구는 포유동물의 천연물대사의 연구를 보완하는 방편으로 적당하지만 미생물에 의한 천연물의 전환과 포유동물의 대사작용과의 상호관계를 설명하기 위해서는 많은 연구가 필요하다. 이미 알려진 다수의 미생물 전환 특성과 장점들을 이용하여 구조적으로 복잡한 새로운 천연물의 생물전환에 대한 연구가 촉진될 것이며, 천연물의 약리학적, 독성학적인 연구를 위한 많은 양의 대사산물을 얻기 위해서는 미생물의 대사작용이 확실히 유용할 것이다. 실제로

사람 간장에 존재하는 대부분의 cytochrome p450은 미생물에서도 발현되므로 후보천연물의 체내대사를 조사하기 위한 예비 수단으로서 성공적으로 사용되고 있다.

천연물대사 연구를 위한 모델로서 미생물 시스템의 이점은 1) 낮은 가격에 쉽게 준비할 수 있는 간단한 배지, 2) 천연물 대사를 하는 균주의 단순한 선별 과정, 3) 빠른 미생물의 대사율에 의해 대사산물의 검정, 분리 및 구조 동정의 수월함, 4) 새로운 대사산물이나 다른 활성을 가진 대사산물의 분리, 5) 가장 알맞는 대사반응의 예상 가능성, 6) 약리학적, 독성학적 연구를 위한 대사산물의 증대의 용이함, 7) 많은 단계가 소요되는 합성반응에 응용, 8) 국부 및 이성체 특이성이 요구되는 반응에 이용, 9) ds화한 배양 조건, 10) 간단하고 저렴한 균주의 유지 등이 있다. 반면에, 미생물 모델의 단점으로는 천연물의 강한 소수성으로 천연물이 대사될 수 없는 경우가 발생할 수 있으며, 미생물은 항상 사람에서처럼 같은 방법으로 천연물의 대사산물을 형성하는 것은 아니다. 게다가 포유류와 미생물에 의한 동질효소(isozyme) 사이에 상관관계는 없으며 미생물에 의한 생물전환 기작은 그다지 알려져 있지 않으며 대사산물의 처리량, 영양학적 요소, 유도제, 환경적 조건에 의해 생물전환이 영향을 받을 수 있다.

미생물의 천연물대사 연구에 관련된 생물전환 반응은 소수성 물질이 더 높은 극성의 대사산물로 전환하는 반응이 대부분이다. (-) 전하의 분자는 세포를 투과하기 어렵고 일반적으로 대사되기가 어려우며 (+) 전하의 높은 소수성 아미노 화합물은 그와 달리 일반적으로 세포를 자유롭게 투과한다. 이러한 화합물은 미생물을 이용한 대사작용 연구에 대해 매우 좋은 소재이다. 소수성 기질은 세포막의 지질층으로 재빨리 흡수되어 종종 수용성 배지로부터 완전히 사라진다. 미생물의 대사과정에서 형성되는 유도체의 대부분은 생성되자마자 세포로부터 배출되어 그 이상의 대사작용이 일어나지 않아 일반적인 추출 방법에 의해서도 배지에서 높은 수율로 분리가 가능하여 특정 대사산물의 분리를 쉽게 한다. 특정 대사산물은 천연물모체로부터 생산되어 크로마토그래피를 통해 구체적인 구조 연구에 사용되며 scale-up 후, 세부적인 약물학적, 독성학 연구에 더 사용되어진다. 유도, 폭기, 효소 저해 등의 배양에 관한 실험

변수를 조절하여 예상하던 대사산물의 생성을 조절하기도 하고, prodrug으로부터 생성된 활성형 대사산물을 동정을 통하여 활성화된 대사산물을 쉽게 예상할 수 있다. 예상하지 못했던 새로운 대사산물이 생성되더라도 그 물질을 동정함으로써 동물에서 일어난 대사 과정을 유추할 수 있다. 또한 높은 활성을 가지거나 낮은 독성을 가진 새로운 대사산물을 발견함으로써 약리학적 연구에 선도물질로서 이용될 수 있다.

약리학적으로 중요한 여러 가지 화합물과 미생물을 사용하여 포유류의 대사작용을 모방하여 전형적인 천연물의 대사작용을 보여준 결과들이 많이 보고되었으며 동물과 미생물 모델 사이에서 천연물 대사작용의 유사점이 많이 강조되었다. 미생물에 의한 전환으로 많은 종류의 포유류내 대사산물을 얻을 수 있으며 약리학적, 독성학 연구를 위한 시료를 준비할 수 있다. 기존의 문헌에 인용된 결과들은 천연물의 해독 작용에 관한 것 보다는 새로운 생리활성 물질을 탐색하는 방향으로 steroids, alkaloids, 항생제 등과 같은 생리활성이 보고된 물질을 대상으로 많이 연구가 되었다. 여러 가지 화학반응 중에서 특히 산화작용을 촉매하는 monooxygenase 반응에서 동물 모델과 미생물 모델은 특별히 유사하며 대사과정의 Phase I 반응에 다양하게 관련되어 있다. *Cunninghamella*속(*C. elegans*, *C. echinulata*)와 *Beauveria bassiana*은 포유류 모델, 기관, 세포 system에 의해 작동되는 모든 종류의 전환을 모방할 수 있는 것으로 알려졌다. 그러나 이러한 균주들이 폭 넓은 대사 능력을 가지고 있지만 실제 동물 대사산물의 모든 과정을 다루기 위해서는 이미 활성이 알려진 다른 균주를 사용할 경우가 있으며 특히 단일 대사산물을 높은 수율로 필요로 할 때 이용된다.

따라서 미생물을 이용한 대사작용 연구는 앞서 언급한 여러가지 장점과 일부의 단점으로 새로운 천연물의 대사과정 연구 및 이로부터 새로운 물질의 개발과 관련하여 가치 있는 방법으로 고려될 수 있다. 천연물의 미생물에 의한 대사작용 연구는 동물 모델을 이용한 대사연구를 진행하기 전이나 동시에 병행할 수 있으며, 이를 통해 구조 동정이나 Phase I 반응에서 대사산물의 표준품을 제공할 수 있다. 실험동물에 의해 얻어지는 모든 대사산물은 크로마토그래피 방법에 의해 분석되고 그 중 어떤 대사산물은 광

범위한 약리학적, 독성학적 연구를 위해 미생물 전환을 통해 충분한 양의 대사산물을 제공할 수 있다. 현재까지의 연구 결과를 통해 미생물 모델이 일반적으로 예상하고 있는 것과 달리 그 결과가 의문스럽더라도 동물모델의 대사과정에서 얻어지는 의약모체로부터 유도되어 독성 또는 활성을 나타내는 후보 대사산물을 미생물 전환에 의해 대사산물을 형성하여 모방함으로써 설명할 수 있다.

미생물을 이용한 대사 연구 방법

포유류 대사의 미생물 모델에의 적용은 일반적으로 다양한 효소와 미생물 촉매에 의해 대사되고 전환되는 미생물의 생물전환 연구에 기초를 두고 있다. 천연물의 포유류의 대사산물을 미생물 모델로 개발하기 위해서는 다음의 세 가지 다른 방법이 제시되었다. 1) 대사 경로를 일단 미생물 모델에서 조사하고 그 결과를 포유류 모델에 추론하여 적용 시키는 것으로 미생물 모델에서의 생성된 표준 대사산물을 이용하여 포유류 모델에서 대사산물의 생성을 예측 및 확인하는 방법이다. 2) 포유류의 대사 경로를 조사하고 미생물 모델에 소급 적용하는 것으로 임시적으로 정한 포유류의 대사산물을 입증하는데 사용되며 두 모델 사이의 생물전환을 더 설명하고 유사함을 설명하는 방법이다. 3) 미생물 모델과 포유류 모델을 동시에 진행하는 것으로 대사산물의 대량생산은 생물학적, 독성학적 평가, 입체화학 및 생성 기작을 규명할 수 있는 방법이다.

이러한 과정에서 적당한 분석적 방법의 개발은 필수적이며 탐색 연구에 앞서 진행되어야 하며, 소량의 대사산물을 분석하기 위해서는 많은 시간과 노동력이 소요된다. 가장 일반적으로 사용되는 분석 방법으로는 thin layer chromatography(TLC), gas chromatography(GC), high performance liquid chromatography(HPLC), mass spectrophotometry(MS)가 장착된 GC-MS, LC-MS, Liquid chromatography가 장착된 nuclear magnetic resonance(NMR)(LC-NMR), 방사선화학 기술 등이 있다. 최근에 개발된 LC-NMR 기술은 미생물 모델을 사용한 비교적 많은 양의 대사산물의 분석에 적합하다. 동정된 대사산물이나 포유류에서 생기는 대사산물을 적용하는 것이 적당한 분석 방법을 개발하는데 중요하다. 만약 대사산물의 기준이

없다면 천연물 전구체나 동일한 구조의 화합물을 분석한 방법을 채택하는 것이 바람직하다.

수 많은 미생물이 문헌에 발표된 천연물기질의 대사 능력에 따라 선정되었다. 첫째 목표는 바라는 미생물 전환을 수행하기 위한 유능한 미생물을 동정하는 것이다. 미생물은 토양, 공기, 오물처리 시설에서 분리할 수 있으며 균주 기탁기관에서 순수배양 형태로 얻을 수 있다. 토양이나 다른 자연적 환경으로부터 새로운 미생물을 분리하는데는 복잡하고 시간소비가 많아서 *O*-and *N*-dealkylations, dehydrogenation, hydrolysis, reductions 그리고 hydroxylations 등의 생물 전환에는 재동정과 이용성으로 문헌에 이미 동정된 미생물을 대부분 이용하고 있다. 어떤 미생물 전환을 수행하기 위해서는 이미 알려진 30~40종 정도의 균주가 적당하다. 미생물은 일반적으로 한천 사면배지에서 자라고 2~8°C에서 보관한다. 1~3달 간격으로 다른 사면배지에 옮겨서 보관해야 하고 미생물 전환연구 때 마다 신선한 배지에서 배양하여 사용한다. 보관된 샘플은 일반적으로 TLC, GC, LC, HPLC 방법에 의해 대사산물이 분석된다.

배양하여 높은 활성을 얻기 위해서는 전 배양과 본 배양의 두 단계 발효과정이 요구된다. 하지만 곰팡이나 초기 단계의 균주 선택 단계에서는 일반적으로 50 ml 배지가 들어있는 250 ml Erlenmeyer 플라스크에서 1 단계로 배양하는 것이 좋다. 곰팡이의 배양은 포자가 형성된 신선한 한천 사면배지에서 시작하고 접종은 포자 현탁액을 사용한다. 곰팡이에는 PDB 배지에서, 세균에는 NB, 효모에는 MGYB 배지를 사용하며, 배양온도는 일반적으로 곰팡이와 효모는 28°C이고 세균은 37°C이며, 48-72 시간동안 120-150rpm으로 진탕배양하여 많은 양의 균배양액을 얻는다. 대사할 천연물은 종균 배양액에 ethanol, acetone, dimethylformamide나 dimethylsulfoxide처럼 배지에 섞일 수 있는 비독성 용매에 1-3% 용액으로 첨가되며, 때때로 0.1% Tween 80과 같은 유화제를 첨가하기도 한다. 초기의 대사 연구를 위해 천연물은 액체 배양액에 200-500 mg/l의 농도로 첨가하고, 천연물이 함유된 후 배지의 pH는 미생물의 활성과 생육에 중요한 역할을 하므로 적절한 pH를 유지한다. 곰팡이의 액체 배양시 pellet의 형태도 대사작용의 활성에 영향을 미치는 것으로 나타나 0.1-1% 한천이나 carboxymethylcellulose, polyvinyl alcohol 등의

수용성 중합체를 첨가하여 pellet의 형성을 줄인다. 균사의 성장을 촉진하거나 microcrystalline cellulose를 첨가하여 균사체의 응집을 방지하고 작은 pellet의 형성을 촉진하여 높은 생물전환율을 유도하였다. 최적의 전환 활성을 위해 미생물의 성장과는 별개로 pH, 폭기, 배지 농도 등의 발효 매개 변수들을 최적화할 수 있다. 대부분의 미생물은 중요한 신진대사 기능을 유지하기 위해 체내에 충분한 영양분을 확보하여 성장하므로 어느 정도의 에너지원의 첨가 없이도 7-10 일간 배양시킬 수 있다. 천연물 기질을 첨가하여 배양한 후, 분석을 위해 24 시간 간격으로 발효액의 1-2 ml 정도를 채취하고, 균주 배양액에서 동일하게 시료를 채취하기 어려우므로 일반적으로 배양 상층액 부분만 취하여 측정한다. 액체 상태의 시료들은 HPLC를 이용하여 직접 분석하거나 TLC나 GC 분석을 위해 유기용매와 함께 반복적으로 추출하여 사용한다. 구조 동정과 생물학적 평가를 위해 다량의 대사산물 생산은 발효조나 큰 플라스크보다도 먼저 최적화시킨 후에 전배양을 실시한다. 배양액의 처리나 잠복 변수 또는 유도제나 저해제의 첨가를 통하여 더욱 특유한 대사산물의 생산을 위해 미생물 전환의 대수기에 최적화시킬 수 있다.

미생물에 의한 천연물의 생물전환

미생물을 이용하여 *in vitro*에서 인위적으로 체내의 대사과정을 모방, 배당체 형태의 생리활성물질을 무배당체로 전환하여 흡수율과 생리활성을 증강, 천연물에 배당체를 결합하여 용해도, 쓴맛의 감소 및 감미효과의 증대, 화학합성이 어려운 화합물이나 전구체를 전환하여 수율을 향상 시키는 등에 관한 결과들이 많이 보고되고 있다. 천연물 내에 존재하는 비활성 형태의 물질로부터 당 결합을 끊을 수 있는 β -glucosidase, pectinase, hemicellulase, lactase 및 cellulase 등의 효소나 이를 생산하는 미생물을 사용하여 천연물내의 배당체 화합물을 무배당체 형태로 전환시켜 이로부터 특정 활성 형태의 유효물질 양을 증가시키거나 유효활성 물질을 효율적으로 추출, 정제하는 연구들도 진행되고 있다. 다양한 종류의 분해 효소를 생산하는 미생물을 이용하여 감귤의 배당체 형태를 무배당체 형태로 전환시키거나, 천연물을 발효하여 발효산물을 건조 분말화하여 특정 성분의

함량 증가, 추출능의 증가, 장내 효과 개선 및 소화 흡수율 등을 높일 수 있을 뿐 만 아니라 발효를 통해 원래의 천연물 보다 생리활성이 증가되거나 새롭게 생합성된 대사산물의 생리활성을 기대할 수 있다 [7]. 항체호르몬제, 근육강화제, 항암제, 경구피임제, 진정제로 사용되고 있는 steroid 화합물에 filamentous fungi, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Streptomyces sp.* 등의 세균을 사용한 생물 전환으로 화학 합성이 어려운 유도체, steroid 화합물의 낮은 용해도 극복, site-selective oxygenation 등 새롭고 유용한 유도체의 개발에 대한 연구가 많이 진행되어 왔다. 천연물의 유효성분은 장내 미생물에 의해 약리적 작용에 의해 생리활성물질로 전환되는 것으로, 사람의 분변을 이용하여 puerarin을 daidzein으로, poncirin을 ponciretin으로, glycyrrhizin을 18 β -glycyrrhetic acid로, ginsenoside Rb1을 compound K로, ginsenoside Rb2를 compound K 등의 유효 생리활성물질로 전환할 수 있었다 [11]. 또한 β -glycosidase, pectinase, cellulase, amylase 등으로 세포벽 성분을 가수분해하여 추출성을 증가하여 olive oil, coconut oil, chili peppers로부터 capsaicin, rice 추출 등에 응용되어 왔다.

당전이 효소에 의한 감귤의 생물전환

감귤의 껍질에 존재하는 무맛의 rutosyl glycosides와 굉장히 쓴맛의 neohesperidosyl 유도체 등의 flavonoid 배당체는 감귤 주스의 향에 중요한 역할을 하지만 역겨운 쓴맛 때문에 구조를 변화하여 쓴맛을 줄이려고 시도되었다. 쓴맛의 neohesperidosyl 배당체를 수소화 반응하여 단맛의 neohesperidin dihydrochalcone(NHDC)으로 전환 한 것이 그 예이다. NHDC는 설탕에 비해 감미도가 1,000-1,500 배, saccharin에 비해 2배나 더 높아, 설탕 대용품이나 향기 증강제 등으로 식품 산업에서 주요한 소재로 고려되고 있으나 낮은 용해도 때문에 응용하는데 많은 제한이 있다. Transglycosylation 반응을 이용하여 rutin, stevioside, rubusoside의 용해도를 증가하거나 고유의 쓴맛을 감소하여 식품소재로서의 특성을 개선하고 있다. 최근 *Bacillus stearothermophilus* maltogenic amylase를 이용하여 NHDC에 maltotriose를 transglycosylation하여 NHDC의 단맛은 7배 저하되지만 용해도가 700 배 증가한 maltosyl-NHDC를 생합성하거나, 유사한 과정으로 naringin에 비해 용해도가 250

배 증가하고 쓴맛이 10배 감소한 glycosyl-naringin을 생합성하였다 [12]. Neohesperidin과 naringin과 같은 flavonoid를 *Bacillus cyclodextrin glucanotransferase*과 cyclomaltodextrin으로 transglycosylation하여 쓴맛이 10배 감소하면서 용해도가 1,500 배 증가한 monoglycosyl-neohesperidin를 제조하거나 쓴맛의 변화는 없으면서 용해도가 1,000 배 증가한 monoglycosyl-naringin을 생합성하였다 [10]. 감귤 주스 산업에서는 쓴맛을 내는 naringin(4,5,7-trihydroxyflavanone-7-rhamnoglucoside)의 화학 구조를 변형해서 쓴맛을 줄이려고 했다. α -Rhamnosidase와 β -glucosidase 활성을 가지고 있는 naringinase를 처리하여 naringin을 가수분해하여 쓴맛이 없는 naringenin을 생성하게 하여 쓴맛을 감소하는 것이다 [1].

장내미생물에 의한 인삼의 생물 전환

인삼(*Panax ginseng*)은 우리나라가 세계에 자랑할 수 있는 대표적인 생약의 하나로서, 만병통치약으로 불려질 만큼 여러 가지 약효를 지닌 신비의 영약으로 먼 옛날부터 민간 및 한의학에서 애용되어 왔다. 최근 인삼에 관한 연구가 각처에서 이루어지면서 그 약효성분의 하나로서 30여 종의 saponin(ginsenoside)이 알려져 있으며, 각각의 saponin은 여러 방면에서 그 효능이 입증되고 있다. 최근에는 saponin의 대사물에 관한 연구가 진행되면서, 인삼 saponin의 약효는 saponin의 형태보다는 그 장내세균 대사물이 활성분체임이 시사되어지고 있다. 인삼의 약리적 효능은 주로 인삼사포닌(ginsenoside)에 관한 것으로서 항암 작용, 면역기능 강화작용, 혈당 강하 작용, 간기능 강화작용, 혈압조절 및 동맥경화 예방작용, 조혈 및 빈혈 회복 효과, 노화방지 효과, 뇌기능 강화작용, 갱년기 장애 개선작용, 항스트레스와 항피로 작용, 항산화 작용, 기초대사촉진, 중추신경작용, 강장효과, 알코올 해독 작용, AIDS 면역 기능 증진, 성기능 부전에 관한 효능, 위장 장애 개선, 불감증, 항위궤양 작용, histamine 및 serotonin 유리작용 등 매우 다양한 생리활성이 보고되었다 [13].

통상 경구 섭취되는 사포닌은 장내 세균에 의해 대사 조절을 받는다. 이러한 인삼을 치료에 응용할 경우 그 약효성분인 saponin은 장내세균에 의해 대사를 받는데, 이들 장내세균군은 사람의 체질 및 식생활의 영향을 받기 쉬우므로 saponin의 대사에 개

인차가 생기고 그로 인한 치료효과의 차이가 생기는 원인의 하나가 되고 있다. 그러므로 원료로 사용되는 수삼은 saponin을 비롯한 여러 가지 유효성분이 고분자 구성성분과 연결되어 있어서 우리가 이것을 섭취했을 경우, 체내에서 분해되어 흡수를 할 수가 없으면 좋은 효과를 볼 수 없으며, 자연 건조된 백삼의 경우 수삼보다는 열수 추출법에 의해 유효성분이 추출이 되어도 체내에서의 분해는 불완전하여 좋은 효과를 기대하기가 어렵다. 가열 건조한 홍삼 역시, 유효성분의 추출은 가능하나 체내 분해 면에서는 불완전하여 더 좋은 효과를 보기 위해서는 열수 추출을 한 뒤 섭취하고 있으며, 홍삼 추출물의 경우에도 methanol로 유효성분을 추출할 수 있지만 체내에서의 분해는 불완전한 것으로 알려졌다. 인삼의 유효성분으로 알려진 인삼사포닌은 섭취 후 사람의 장내에 서식하는 특유의 미생물에 의해 분해되지 않고서는 체내에 흡수가 되지 않아 그 약효를 발휘할 수가 없으므로 반드시 장내에 서식하는 미생물에 의해 분해가 되어 저분자의 형태로 흡수되어야 한다 [8].

장내 미생물에 의한 인삼사포닌 가수분해 능력은 개개인마다 차이를 보여, 조사 대상의 21% 정도는 인삼사포닌을 분해하는 미생물을 보유하지 않았으며 분해미생물을 보유한 79%에서도 인삼사포닌을 분해하는 능력에 차이를 보였다 [3,4]. 인삼사포닌은 경구 섭취 후, 장내에서 미생물에 의해 가수분해되어 시간이 지남에 따라 인삼사포닌의 기본 골격인 비배당체의 C-3와 C-20 위치의 hydroxy기에 결합된 oligosaccharides가 장내미생물에 의해 단계적으로 분해되어 결국에는 saponin 대사산물인 20-O- β -D-glucopyranosyl-20(S)-protopanaxadiol(IH-901, compound K) 등의 유효성분으로 전환되는 것으로 밝혀졌다 [5,6]. 즉, 인삼사포닌의 생리활성은 장내 미생물에 의해 분해되었을 때 비로소 그 효능을 발휘하는 것으로, 인삼사포닌을 분해하는 장내미생물은 사람의 체질이나 건강, 환경, 식습관이 다른 민족 차에 따라 존재 유무와 보유하고 있는 정도가 다르기 때문에 인삼을 복용한 뒤 흡수 정도에 차이를 보여 체내에서의 효능면에서 차이가 보인다. 따라서 인삼사포닌을 분해하는 장내미생물로서 인삼을 발효시킴으로써 이러한 흡수와 효능의 차이를 없애 누구에게서도 효능을 발휘할 수 있는 표준제품을 개발할 수 있다.

원광대학교 약학대학 김재백 교수팀에 의해 국내에서 처음으로 4년근 인삼을 적정온도에서 산도(pH), 수분을 조절하여 1개월 가량 발효시킨 다음 말려 분말로 제조 약리성분을 대폭 향상시킨 효삼(酵蔘)을 개발하였다. 또한 일화 중앙연구소와 경희대학교 약학대학 김동현 교수팀에 의해 세계최초 유산균 발효 인삼을 개발하여 인삼 사포닌의 대사 물질인 IH-901의 암 전이 억제 능력과 건강 증진 작용 등을 확인하였다. 인삼 농축액을 유산균으로 발효하여 사포닌 함량과 흡수력을 높여 인삼과 유산균의 효과를 동시에 내는 인삼 제품 락토진생을 출시하여 장내의 부패균 번식을 억제하고 유익균의 번식을 도와 장을 건강하게 하고, 인삼의 항암 및 건강 증진작용 효과를 함께 주는 것이 특징이다.

생균제를 이용한 인삼의 생물 전환

생균제 (Probiotics)는 Parker (1974)에 의해 “장내 미생물 균형에 도움을 주는 미생물 혹은 첨가물”로 제안되면서 Fuller (1989)에 의해 “장내 미생물의 균형을 개선함으로써 숙주에 유익하게 작용하는 살아있는 미생물 첨가물”로 정의되었다. 현재 상업적으로 사용되는 생균제는 젖산균 간균으로는 *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. salivarius*, *Lb. plantarum*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. casei*, 젖산균 구균으로는 *Enterococcus faecium*, *Ec. faecalis*, *Streptococcus thermophilus*, 비피더스균으로는 *Bifidobacterium thermophilum*, *Bif. Bifidum*, *Bif. pseudolongum*, 효모로는 *Saccharomyces cerevisiae*

고초균으로는 *Bacillus subtilis*, *B. coagulans*, 국균으로는 *Aspergillus oryzae*, 낙산균으로는 *Clostridium butyricum* 등이 사용되고 있다. 천연물을 구성하고 있는 성분들은 탄수화물, 질소화합물, 지용성 화합물 및 기타 미네랄 등으로 미생물이 발효하는데 필요한 모든 성분을 함유하고 있다. 인삼의 경우, saponins(protoanaxadiols, protoanaxatriols, oleanolic acids)은 3-6%, 질소화합물(단백질, amino acids, peptides, 핵산, alkaloids)은 12-16%, 지용성 화합물(지질, 지방산, essential oils, terpenoids, polyacetylenes, phenolic compounds)은 1-2%, vitamins(thiamine, riboflavin, ascorbic acid, niacin, biotin, folic acid)은 0.05%, 탄수화물(다당류, lignans)은 60-70%, 무기화합물(N, P, K, Ca, Mg 등의 미량원소)은 4-6%로서 천연의 배

지성분으로 적합하며 특정 미생물의 발효를 위해 일부 성분만을 보충해 줌으로써 미생물을 이용하여 발효 혹은 생물전환을 할 수 있다.

인삼발효에는 *Lactobacillus plantarum* KCTC3108, *Lactobacillus acidophilus* KCTC3155, *Bacillus subtilis* KCTC1666, *Saccharomyces cerevisiae* KCTC7919, *Aspergillus oryzae* KCTC6292 등을 사용한다. 고체 및 액체 배양배지는 *Lactobacilli* MRS(Difco, Detroit, USA), *Bacillus*는 nutrient broth(NB, Difco)를, *Saccharomyces*는 YM broth(Difco), *Aspergillus*는 potato dextrose 배지(Difco)를 사용하며, 배양조건은 *Saccharomyces*와 *Aspergillus*인 경우 30°C에서 *Bacillus*는 37°C에서 5일 간 120rpm으로 진탕 배양하며, *Lactobacillus*는 37°C에서 5일 간 정지배양을 한다. 발효한 인삼을 대상으로 주요 생리활성 성분인 saponin의 함량과 발효에 의해 생성되는 대사산물을 분석하기 위하여 배양액을 MeOH로 추출하고 ethylacetate(EtOAc)로 추출하여 saponin이 포함하고 있는 분획물을 thin layer chromatography(TLC)(silica TLC plate 0.25 mm ; C/M/W=4/2/1, lower phase)(역상 RP-18 0.20 mm ; 70% MeOH)와 high performance liquid chromatography(HPLC)(60~100% MeOH ; 고정상, YMC C₁₈ column ; detector, PDA)하여 saponin의 함량 및 대사산물의 변화를 측정할 수 있다.

결론

인삼을 장내 미생물이나 상업적으로 사용되는 생균제를 이용하여 발효함으로써 장내 미생물의 유무나 가수분해 능력의 차이로 인한 흡수와 효능의 차이를 없애며 유효성분의 추출을 증가하고 체내에서 분해되어 흡수를 높일 수 있게 할 수 있다. 미생물로 인삼을 발효하는 동안 인삼사포닌을 비롯한 유효성분이 분해되어 분자량이 작아져서 경구 섭취할 경우, 체내 흡수가 잘 되며 피부 마사지를 통해서도 잘 흡수되어 국소적으로 여러 가지 유익한 작용을 할 수 있다. 인삼사포닌을 분해하는 β -glucosidase를 세균, 곰팡이, 효모, 담자균 등의 미생물로부터 얻어, protoanaxadiol-type saponin의 당기를 분해하여 희소한 사포닌 Rh1, Rh2를, α -rhamnosidase로 protoanaxatriol-type 인삼 saponin Re를 가수 분해하여 Rg1을, Rg2를 가수분해하여 Rh1을 제조하였다. 또

한 saponin 효소나 이 효소를 생산하는 미생물을 배양하여 혼합 인삼 saponin을 반응시켜서 항암성 saponin Rh1, Rh2의 함량이 높은 혼합 saponin을 생산하였다. (주)일화의 경우, 인삼농축액을 유산균으로 발효하여 암의 전이 억제, 면역증강, 항알레르기 작용이 증강된 락토진생을 개발하여 상업화하였으며 서울대학교와 (주)제일제당의 연구팀은 인삼을 특수 가공하여 홍삼에만 미량이 들어있는 특유의 약효성분인 인삼사포닌 Rg3, Rg5 등이 산삼보다 8배 이상 월등한 선삼을 개발하였다. 또한 감귤의 발효를 통해 소화 흡수율과 생리활성이 강화된 무배당체의 화합물을 제조할 뿐 만 아니라 감귤에 함유되어 있는 무맛의 rutosyl glycoside, 쓴맛의 neohesperidosyl 유도체 등의 flavonoid 배당체를 생균제가 생산하는 배당체 분해 효소나 생합성 효소에 의해 당 결합이 분해됨으로써 감귤 특유의 쓴맛이 반감되거나 설탕, saccharin 보다 단맛이 강화된 감미료로 전환 및 용해도를 증가하였다.

인삼, 감귤과 같은 생리적 효능이 확인된 천연물을 식용가능하며 상업적으로 이용되는 생균제를 이용하여 발효함으로써 생균제에 의해 생산되는 다양한 가수분해효소에 의해 천연물로부터 생리활성물질의 추출성을 증가시키거나 저분자 화합물로의 전환에 의한 체내 흡수성의 증대를 기대할 수 있다. 또한 생균제의 생합성 효소에 의해 천연물내의 구성성분을 이용하여 대사산물의 전환으로 새로운 생리활성물질을 개발하거나 당의 결합에 의한 감미료와 같은 새로운 기능성 식품소재를 개발하여 사료첨가제, 식품가공의 첨가제, 기능성식품, 건강보조식품으로 사용할 수 있다. 또한 유용 생물자원 중에 존재하는 배당체 형태의 화합물을 미생물에 의하여 무배당체로 만드는 방법을 이용하여 참깨로부터 sesaminol, 상백피와 포도로부터 resveratrol, 백강잠, 상백피, 닭의장풀로부터 1-deoxy nojirimycin, 은행잎, 메밀, 양파로부터 quercetin, 황금으로부터 baicalin 등의 무배당체로의 전환에 활용할 수 있으며 장내 미생물을 이용하여 puerarin을 daidzein으로, poncirin을 ponciretin으로, glycyrrhizin을 18b-glycyrrhetic acid으로 ginsenoside Rb1과 ginsenoside Rb2를 compound K 등의 생리활성이 증강된 유효성분으로 전환할 수 있다.

감사의 글

본 연구는 해양수산부 마린바이오 21사업의 해양 바이오프로세스 연구단 연구비 지원 (과제관리번호 M2007-06)에 의해 수행되었습니다.

참고 문헌

1. Cho, J. S., Yoo, S. S., Cheong, T. K., Kim, M. J., Kim, Y. and Park, K. H. 2000. Transglycosylation of neohesperidin dihydrochalcone by *Bacillus stearrowthermophilus* maltogenic amylase. *J. Agric. Food Chem.* **48(2)**, 152-154.
2. Harvey, A. 2000. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discovery Today* **5(7)**, 294-300.
3. Hasegawa, H. and Uchiyama, M. 1998. Antimetastatic Efficacy of orally administered ginsenoside Rb₁ in dependence on intestinal bacterial hydrolyzing potential and significance of treatment with an active bacterial metabolite. *Planta Medica* **64**, 696-700.
4. Hasegawa, H., Sung, J. H. and Benno, Y. 1997. Role of human intestinal *Prevotella oris* in hydrolyzing ginseng saponins. *Planta Medica* **63(5)**, 436-440.
5. Hasegawa, H., Sung, J. H., Matsumiya, S. and Uchiyama, M. 1996. Main ginseng saponin metabolites formed by intestinal bacteria. *Planta Medica* **62**, 453-457.
6. Hasegawa, H., Lee, K. S., Nagaoka, K., Tezuka, Y., Uchiyama, M., Kadota, S. and Saiki, I. 2000. Pharmacokinetics of ginsenoside deglycosylated by intestinal bacteria and its transformation to biologically active fatty acid esters. *Biol. Pharm. Bull.* **23(3)**, 298-304.
7. Izumi, T., Piskula, M. K., Osawa, S., Obata, A., Tobe, K., Saito, M., Kataoka, S., Kubota, Y. and Kikuchi, M. 2000. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *J. Nutrition* **130(7)**, 1695-1699.
8. Karikura, M., Miyase, T., Tanizawa, H., Taniyama, T. and Takino, Y. 1991. Studies on absorption, distribution, excretion and metabolism of ginseng saponins. VI. The decomposition products of ginsenoside Rb₂ in the stomach of rats. *Chem. Pharm. Bull.* **39(2)**, 400-404.
9. Knight, V., Sanglier, J. J., DiTullio, D., Braccili, S., Bonner, P., Waters, J., Hughes, D. and Zhang, L. 2003. Diversifying microbial natural products for drug discovery. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62(5-6)**, 446-458.
10. Kometani, T., Nakae, T., Nishimura, T., Takii, H. and Okada, S. 1996. Synthesis of neohesperidin glycosides and naringin glycosides by cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus* species. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60(4)**, 645-649.
11. Lee, D. S., Kim, Y. S., Ko, C. N., Cho, K. H., Bae, H. S., Lee, K. S., Kim, J. J., Park, E. K. and Kim, D. H. 2002. Fecal metabolic activities of herbal components to bioactive compounds. *Arch. Pharm. Res.* **25(2)**, 165-169.
12. Lee, S. J., Kim, J. C., Kim, M. J., Kitaoka, M., Park,

- C. S., Lee, S. Y., Ra, M. J., Moon, T. W., Robyt, J. F. and Park, K. H. 1999. Transglycosylation of naringin by *Bacillus stearothermophilus* maltogenic amylase to give glycosylated naringin. *J. Agric. Food Chem.* **47(9)**, 3669-3674.
13. Park, C. K., Jeon B. S., and Yang, J. W. 2003. The Chemical Components of Korean Ginseng. *Food Industry & Nutrition* 8(2), 10-23.
14. Venisetty, R. K., and Ciddi, V. 2003. Application of microbial biotransformation for the new drug discovery using natural drugs as substrates. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **4(3)**, 153-167.