

흰쥐의 장내미생물로부터 분리한 새로운 페놀 설포트랜스페라제

김형수 · 김동현*

경희대학교 약학대학

(Received March 23, 1992)

Novel Phenol Sulfotransferase of *Klebsiella* K-36, Rat Intestinal Bacteria

Hyung-Soo Kim and Dong-Hyun Kim*

College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

Abstract—*Klebsiella* K-36 producing novel sulfotransferase was isolated from rat intestinal flora. The novel sulfotransferase catalyzed the transfer of sulfate group from p-nitrophenylsulfate to phenolic compounds but it did not use PAPS(3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate) as a donor substrate. The present enzyme was 160 K daltons. Optimal pH was 10. When p-nitrophenyl sulfate was used as a donor substrate, 1-naphthol was the best substrate, followed by phenol, phenanthrol and tyrosine. The apparent K_m for phenol using p-nitrophenylsulfate as a donor substrate and that for p-nitrophenylsulfate using phenol as an acceptor substrate were determined to be 0.66 mM and 0.11 mM, respectively.

Keywords □ Sulfotransferase, sulfoconjugation, intestinal bacteria, *Klebsiella* K-36.

Baumann이 개를 이용한 phenol의 대사에 관한 실험에서 먹이에 phenol을 혼합투여하면 생체내에서 phenyl sulfate로 대사가 됨을 밝힌 이래,¹⁾ 외인성 및 내인성 phenol계 화합물의 해독반응은 간장이나 신장에서 대부분 글루쿠론산 포함과 황산포합에 의해 이루어지는 것으로 알려져있다.²⁾ 이러한 phenol계 화합물의 황산포합에 관여하는 phenol sulfotransferase (EC.2.8.2.1.)는 guinea pig의 간에서 분리된 이후 뇌, 신장 및 장의 상피세포등 포유동물의 여러조직에서 이 효소의 존재가 밝혀졌고,³⁻⁵⁾ 미생물⁶⁾로부터도 분리 정제되었다. 이들 효소의 공통적인 특징은 공여체 기질로 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate(PAPS)만을 이용하여 황산전이반응을 촉매하며, 생체내에서 해독반응에 관여한다고 사려된다.^{7,8)} 사람을 포함한 포유동물의 장내에는 약 100여종 총 균수는

1g당 10^{10} — 10^{12} 개의 장내미생물이 존재하며⁹⁾ 이들의 장내미생물은 경구투여 또는 담관을 통해서 담즙과 함께 배출되는 phenol계 화합물의 대사에 관여할 것으로 사려되나 거의 연구가 되지 못했다. 그중에서 흥미있는 것은 사람의 장내 세균총으로부터 sulfotransferase 생성균주(*Eubacterium* A-44)가 분리되었으며, 그 균주로부터 sulfotransferase가 분리 정제되었다. 이 효소는 지금까지 보고된 황산전이효소와는 전혀 달리 sulfate 공여체로 PAPS가 아닌 phenylsulfate ester 화합물을 이용하는 효소임이 밝혀졌다.^{10,11)} 이 효소를 생산하는 장내 미생물은 생체내에서 acetaminophen의 약물대사에 관여하여 황산포합체를 형성한다고 보고되었다.¹²⁾

본 실험에서는 실험동물로 널리 사용되고 있는 흰쥐에 대하여 새로운 sulfotransferase 생성하는 균주의 분리 및 그 효소의 정제를 시도하였다.

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

실험재료 및 방법

시약 및 균주—general anaerobic medium(GAM), tryptic soy agar(TS), glucose blood liver broth(BL), Eggerth and Gagnon(EG) 배지는 일본 Nissui 제약(주)으로부터 구입했으며, EG, BL배지는 Mitsuka⁹⁾의 방법에 따라 제조하여 사용하였다. p-nitrophenyl sulfate(PNS), tyramine, 4-methylumbelliferyl sulfate(MUS), adenine, serine, cysteine, DEAE-cellulose는 Sigma사로부터 구입했다. phenol, 1-naphthol, p-aminophenol은 일본 Wako Pure Chemical Industries Co.로부터 구입했다. 9-phenanthrol은 Aldrich사로부터, Sephacryl S-300 Superfine, molecular weight kit는 Pharmacia사로부터 구입했다. Eubacterium A-44의 sulfotransferase 효소는 Kim¹⁰⁾ 등의 방법에 준하여 분리 정제하여 사용했다.

Sulfotransferase 효소 활성 측정—공여체기질로 50 mM p-nitrophenyl sulfate(PNS) 30 μ l (경우에 따라서는 같은 농도의 phenylsulfate ester 화합물), 수요체기질로 20 mM tyramine 0.29 ml (경우에 따라서는 같은 농도의 phenol성 화합물), 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 8.0) 0.21 ml, 효소액을 0.1 ml을 넣어, 37°C에서 20분간 반응시킨 후, 0.4 ml의 1 N-NaOH를 넣어 반응을 정지시킨 후, 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Sulfatase 효소 활성 측정—Sulfatase 효소 활성 측정은 sulfotransferase 효소 활성 측정에서 수용체기질 대신 증류수 0.29 ml를 넣고 sulfotransferase 효소 활성 측정 조건과 동일하게 측정하였다.

흰쥐의 장내용물의 효소활성—흰쥐 (Wistar계, 수컷, 180~200g)를 한 군에 3마리씩으로 하여 혼합 항생물질 (chloramphenicol, streptomycin, penicillin, erythromycin, nystatin의 혼합 현탁액)를 투여한 군과 투여하지 않은 군으로 나누어, 경구 투여 후 24시간마다 흰쥐 분변의 sulfotransferase와 sulfatase 효소 활성을 측정하였다. 또한, 흰쥐를 ether로 마취 후 도살하여 장관을 위, 소장(상, 하부), 맹장, 대장(상, 하부), 분등 7개 부분으로 나누어 내용물을 채취하여 10 mM tris-HCl buffer(pH 7.0)을 내용물 g당 10 ml되도록 넣어 현탁시킨 후, sulfatase와 sulfotransferase의 효소활성을 pH 7.0과 pH 7.8에서 측정하였다.

흰쥐의 먹이와 분에 존재하는 sulfotransferase의

수용체 기질 특이성—흰쥐의 먹이와 분을 각각 1g 채취하여 20 mM tris-HCl buffer(pH 7.0) 10 ml에 현탁시켜 2 mg/ml가 되도록 희석하였다. 분의 현탁액은 끓는 물에서 10분간 처리한 후 사용하였다.(단, 대조액으로 tyramine도 2 mg/ml가 되도록 희석하였다.) 이들 g희석액 0.5 ml에 0.1 M tris-HCl buffer(pH 7.8) 0.42 ml, 50 mM PNS 0.06 ml와 효소액(A-44균주 유래) 0.2 ml를 넣고 37°C에서 반응시킨 후, 0.2 ml의 trichloroacetic acid를 첨가한 후, 3000 rpm에서 20분간 원심 분리하였다. 이 상등액 0.73 ml에 0.3 ml의 1 N-NaOH를 넣어 p-nitrophenol의 흡광도를 405 nm에서 측정하여 tyramine과 비교했다.

Sulfotransferase 생성 균의 검색¹³⁾—흰쥐의 분을 10⁷배까지 희석한 액을 0.1 mM 4-methylumbelliferyl sulfate을 함유하는 GAM, BL, EG agar plate에 접종고 37°C에서 3~5일간 배양한 후, UV lamp하에서 형광을 나타내는 colony들을 sulfotransferase 양성균으로 하였다. 이 양성균에 대해서는 500 ml GAM배지 또는 brain heart infusion배지에서 배양하여 효소활성을 확인한 후, 효소활성이 있는 균에 대해서 황산전이 효소 생성균으로 하였다.

균의 동정¹⁴⁾—Bergey's Manual에 따라 동정하였다.

균의 성장곡선과 효소활성의 시간별 측정—Seed culture한 배양액을 500 ml의 LB배지에 균을 접종시키고 37°C에서 배양하며 매 3시간마다 1 ml씩 채취하여 그 흡광도를 550 nm에서 균의 탁도를 측정 후, 이액을 3000 rpm에서 20분간 원심 분리한 후 초음파처리하여 이 액을 효소액으로하여 sulfotransferase 효소활성을 측정하였다.

Klebsiella K-36 균주로부터 sulfotransferase의 부분 정제—흰쥐의 분으로부터 분리한 *Klebsiella* K-36 균주를 3 L의 LB broth에 seed culture한 배양액 30 ml를 이식하여 약 1일간 진탕 배양하였다. 배양한 균액을 4°C에서 7000 rpm으로 30분간 원심분리하여 침전시킨 후 생리식염수액으로 2회 세척하였다. 이 균체를 150 ml의 20 mM tris-HCl buffer(pH 7.0)에 현탁시켜, 초음파 처리하여 균을 파괴한 후 7000 rpm으로 30분간 원심 분리하여 상등액을 조효소액으로 하였다. 이 조효소액에 (NH₄)₂SO₄를 넣어 65%포화액으로 하여 충분히 교반후 원심 분리하여 효소를 침전시켰다. 이 침전을 20 mM tris-HCl buffer(pH 7.0) 60 ml에 용해시킨 후, 2 L의 같은 완충액으

Table I—Enzyme activity of sulfotransferase and sulfatase in feces of rats

Acceptor	Enzyme Activity ($\mu\text{mol/h/g}\cdot\text{feces}$)	
	Sulfotransferase	Sulfatase
Phenol	2.50	
1-Naphthol	4.24	0.53
9-Phenanthrol	2.95	
Creosote	1.51	

로 8시간 마다 3회 투석시킨 후, 투석시킨 효소액을 미리 20 mM Tris-HCl Buffer(pH 7.0)로 균형화 시킨 DEAE-cellulose column(2.5×30 cm) chromatography를 사용하여 같은 완충액 200 ml로 세척한 후, 같은 완충액 200 ml와 0.5 M KCl를 함유하는 동일 완충액 200 ml로 직선농도구배를 걸어 fraction마다 흡광도(파장 280 nm)와 효소 활성을 측정했다. DEAE-cellulose column에서 분취한 fraction중에서 효소활성이 높은 fraction No. 58에서 75까지를 모아서 ultrafiltration(Amicon)하였다. 이 효소액을 미리 0.1 M tris-HCl buffer(pH 7.0)로 균형화시킨 Sephacryl S-300 Superfine column(2×86 cm)을 사용하였다. 효소 활성은 fraction No.65~68에서 나타났다.

단백량 측정¹⁵⁾—단백질량 측정은 bovine serum albumine을 표준으로 하여 Lowry 등의 방법에 따라 시행하였다.

효소의 분자량 측정—효소의 정제에 사용했던 Sephacryl S-300 superfine column을 사용하여 효소의 분자량을 측정했으며, molecular marker로서는 Pharmacia molecular kit를 사용했다.

결과 및 고찰

흰쥐의 분에 있어서 효소활성—흰쥐의 분중의 sulfotransferase 및 sulfatase의 효소 활성을 측정한 결과는 Table I과 같다.

흰쥐분의 sulfotransferase의 효소활성은 수용체로서 1-naphthol을 사용했을때 가장 높았으며 이때 효소활성은 4.24 $\mu\text{mol/h/g}$ wet feces였다. 그 다음이 9-phenanthrol, phenol, creosote의 순이었다. 효소 활성에 있어서는 사람의 경우보다 4~6배 낮았으나 sulfotransferase 효소 활성은 sulfatase 효소 활성보다 훨씬 높게 나타났다. 특히 여기에서 측정한 sulfatase

Table II—Acceptor substrate specificity (Donor substrate, PNS)

Substrate*	Activity(unit/mg protein)
Inactivated rat feces**	0.62
Rat diet	0.49

*Final concentration; 2 mg/ml.

**Heated at 90°C for 10 min.

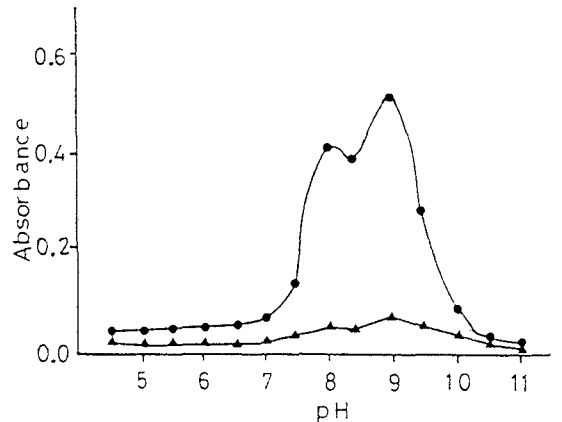


Fig. 1—pH profile of sulfotransferase (●) and sulfatase (▲) of rat feces. Buffer used; pH 4.5~6, 0.1 M acetate buffer. pH 6~7, 0.1 M phosphate buffer. 7~9 tris-HCl buffer. pH 9~11, NaOH-glycine buffer.

효소 활성 수치의 결과는 sulfatase 효소활성만의 결과라고는 생각되지 않는다. 장내용물중에 존재하는 phenol 화합물이 sulfotransferase 효소의 수용체 기질로서 작용하여 나타나는 수치도 일부 포함되어 있을 것으로 생각된다.

흰쥐의 먹이와 분에 존재하는 sulfotransferase의 효소의 기질특이성—장내에 존재하는 내용물 및 쥐 먹이에 대한 효소의 기질 특이성을 조사한 결과는 tyramine 및 phenol 보다는 낮은 활성이지만 분이나 먹이중에는 sulfotransferase 수용체가 존재하고 있었다.(Table II) 이 결과는 앞에서 장내에 sulfatase 활성의 일부가 황산전이효소에 기인되고 있음을 시사하고 있다.

장내용물에 존재하는 효소활성에 대한 optimal pH.—장내에 존재하는 sulfotransferase 및 sulfatase의 효소 활성에 대한 pH profile은 Fig. 1에 나타났다. Sulfotransferase에 있어서 optimal pH는 알칼리성이었으며 pH 8과 pH 9.5~10이었다.

Table III—The activity of enzymes in the intestinal contents of normal and antibiotics treated rats

	Stomach	Duodenum	Jujunum	Caecum	Upper Colon	Lower Colon	Feces
Enzymes (treated with antibiotics)							
Sulfatase (nmol/min/g)	0.1	1.3	1.5	1.8	1.1	1.9	1.3
Sulfotransferase (nmol/min/g)	1.9	1.6	1.9	0.9	1.9	0.9	0.2
Enzymes (normal)							
Sulfatase (nmol/min/g)	2.6	0.2	4.1	5.6	3.4	3.0	3.8
Sulfotransferase (nmol/min/g)	2.8	7.0	12.8	25.2	19.4	16.4	16.9

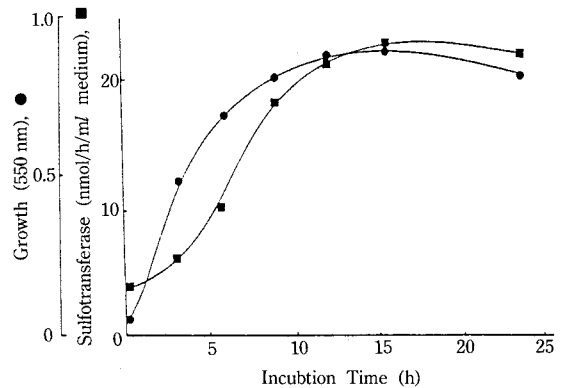
흰쥐의 장내용물의 효소 활성—흰쥐의 분중에 sulfotransferase 효소 활성은 ≥ 40 nmole/min/wet feces 였으며 sulfatase는 sulfotransferase의 효소 활성의 1/10 정도 밖에 되지 않았다. 이들 효소 활성은 항생제 투여에 의해 현저히 저하되었으며, 투여 3일 후에는 거의 대조군의 5% 정도 밖에 되지 않았다. 장내 부위별 장내용물의 효소 활성을 pH 7.0에서 측정된 결과는 Table III에 나타냈다. 그리고, 항생제의 투여를 중지하면 효소 활성은 서서히 회복하여 약 1개월 후에는 원상 회복되었다. Sulfatase와 sulfotransferase의 효소활성은 대조군에 있어서 맹장이 가장 높았으며, sulfatase에 비해 sulfotransferase의 활성이 훨씬 높게 나타났다. 두 효소 모두 항생제 투여군에서는 거의 활성이 없었다. 여기에서의 sulfatase 효소 활성은 장내용물중에 함유된 phenolic 물질이 sulfotransferase의 수용체 기질로 작용하여 실제 값보다 높게 나타났으리라 사려된다.

흰쥐로부터 새로운 sulfotransferase를 생성하는 균의 검색—흰쥐에서 sulfotransferase 양성균으로 확인된 균주중에서 가장 강한 활성을 나타내는 것은 K-1, K-8, K-15, K-36이었다. 이중에서 활성이 높은 K-36 균주에 대하여 동정하였다.

K-36균의 동정—K-36 균주는 혐기적 및 호기적 양조건에서도 잘 자라는 통성혐기성 균이고, Gas를 생산하며 포자를 생성하지 않는 Gram음성의 간균이었다.

Urease, methyl red 및 indole test는 양성이고, H₂S 생성 및 oxidase test는 음성이었으며 운동성은 없었다. 그외 Simmons' citrate test는 약한 양성이었으며, Voges-Prokauer test는 양성이었다. 이것으로 보아 이균은 Enterobacteriaceae의 *Klebsiella oxytoca*로 사려된다.

***Klebsiella K-36*균의 성장곡선과 효소 활성의 시간**

**Fig. 2**—Time course of the bacteria growth and novel sulfotransferase production.

별 측정—*Klebsiella K-36* 균주를 LB 배지에서 37°C를 유지하며 배양하면서 효소활성을 측정된 결과 Fig. 2에 나타난 것 처럼 13~18시간에서 균의 성장이 가장 높고, 그후 약간 감소하였다. 효소의 활성은 16시간 배양했을 때 가장 높았다.

***Klebsiella K-36*로부터 sulfotransferase의 분리 정제**—K-36 균을 LB배지에서 배양하여 집균한 후 초음파 파괴한 것을 조효소액으로 하여 65% (NH₄)₂SO₄분획 DEAE-cellulose column chromatography 및 Sephacryl S-300 fine column chromatography순으로 정제하여 specific activity가 0.74 μmol/min/mg protein으로써 조효소액의 약 50배 정제하였으나, 완전히 정제된 효소를 얻지는 못했다(Table VI).

***Klebsiella K-36*에서 분리한 sulfotransferase의 반응 양식**—이 효소는 공여체인 phenyl sulfate ester 화합물로부터 sulfate기를 수용체인 phenol이 존재할 때 수산기에 전이 시키는 sulfotransferase였다. PNS와 phenol이 반응시간과 함께 等量씩 감소하며 반응 생성물인 phenyl sulfate와 p-nitrophenol을 등량씩 생성하였다. 따라서 이 효소는 sulfatase 반응은 전혀

Table VI—Partial Purification of Novel Sulfotransferase from *Klebsiella* K-36

Stage	Activity (μmol/min)	Protein (mg)	Sp. Activity (μmol/min/mg)
Crude Extract	3.47	204	0.017
65% (NH ₄) ₂ SO ₄	2.31	165	0.014
DEAE-cellulose	1.10	9.2	0.12
Sephacryl S-300	0.87	1.2	0.74

Table V—Acceptor substrate specificity (Donor, PNS)

Acceptor	Activity (%)	
	K-36 Sulfotransferase*	A-44 Sulfotransferase**
Phenol	100	100
p-Acetaminophen	3	129
Tyramine	8	100
Tyrosine	13	0.2
1-Naphthol	271	1560
9-Phenanthrol	24	1396
Adenine	0	0
Serine	0	0
Galactose	0	0

*Specific activity of the enzyme for PNS+Phenol was 0.2 μmol/min/mg protein.

**Specific activity of the enzyme for PNS+Phenol was 26 μmol/min/mg protein.

촉매하지않고, 수용체 기질이 없이는 반응이 진행되지 않으며, sulfate기의 전이만을 촉매하는 sulfotransferase임을 알 수 있었다.

Klebsiella K-36 sulfotransferase와 Eubacterium A-44의 sulfotransferase의 기질특이성 비교—*Klebsiella* K-36 sulfotransferase의 수용체에 대한 기질 특이성을 *Eubacterium* A-44 sulfotransferase와 비교한 것을 Table V에 나타냈다.

K-36 sulfotransferase의 가장 큰 특징은 A-44 sulfotransferase¹⁰⁾와 같이 방향성이 높은 1-naphthol에 대해 A-44 sulfotransferase보다는 낮으나 높은 활성을 나타냈으며, 9-phenanthrol 수용체에 대해서도 A-44 균주의 효소 보다는 낮으나, 좋은 기질특이성을 나타냈으며, A-44 sulfotransferase에대한 우수한 기질인 p-acetaminophen, tyramine은 K-36 sulfotransferase에게는 좋은 기질이 되지 못했다. 그러나 tyrosine은 A-44 sulfotransferase보다 K-36 sulfotransferase에 좋은 수용체 기질이었다. adenine, serine, cysteine,

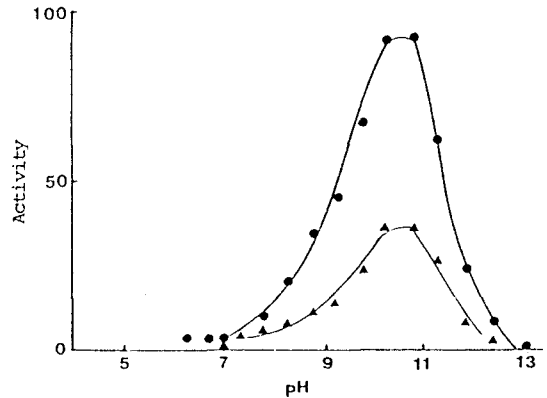


Fig. 3—pH profile of novel sulfotransferase activity: enzyme activity was assayed by a standard condition except 1-naphthol (●) and phenol (▲) as an acceptor.

galactose, glucose 및 지방족 alcohol은 기질이 되지 못했다.

일반적인 성질—K-36 sulfotransferase의 optimal pH는 phenol과 1-naphthol의 경우 9.5-10.5로서 알칼리 영역이었다(Fig. 3). 이러한 결과는 A-44균주의 sulfotransferase가 optimal pH 7.5~8.5인 것과 비교해 볼때 현저한 차이를 나타낸다. K-36 sulfotransferase의 분자량을 gel filtration을 이용하여 측정된 결과 약 16만 dalton이었다. A-44균주의 Sulfotransferase의 분자량은 31만 5천 dalton이었다. 효소에 대한 기질의 친화성은 공여체 기질의 경우 PNS를 사용했을 때 수용체 phenol에 대한 Km은 0.66 mM이었으며, 수용체 기질로 phenol을 사용했을때 공여체 기질인 PNS에 대한 Km은 0.11 mM이었다.

이와 같이 *Klebsiella* K-36의 sulfotransferase 효소는 기질특이성, 최적 pH, 분자량 등을 *Eubacterium* A-44의 sulfotransferase와 비교해볼때 다른 효소라고 생각된다.

결 론

원취의 장내 미생물로부터 phenol 화합물의 해독에 기여하리라고 사료되는 황산 전이 반응을 촉매하는 효소를 생산하는 균주인 *Klebsiella* K-36균주(*K. oxytoca*)를 분리했으며, 이 균주로부터 분리한 sulfotransferase는 분자량이 16만 dalton으로, 효소 반응의

최적 pH는 약 10이었다. 이 sulfotransferase는 현재 까지 알려진 sulfotransferase가 공여체 기질로 PAPS만을 이용하는 것에 반하여, *Eubacterium* A-44 균의 sulfotransferase와 마찬가지로 phenolic sulfate esters를 공여체 기질로 이용한다. 공여체 기질로 p-nitrophenylsulfate을 사용했을 때, 수용체 기질특이성은 1-naphthol, phenol, 9-phenanthrol, tyrosine 순이고, 이때 phenol의 Km은 0.66 mM이었으며, 수용체 기질로 phenol를 사용했을때 p-nitrophenylsulfate의 Km은 0.11 mM이었다. 이효는 *Eubacterium* A-44로부터 분리 정제된 분자량 315,000 dalton, 효소 반응 최적 pH 7.5~8.0인 sulfotransferase와는 다른 새로운 황산 전이 효소였다.

끝으로 *Klesiella* K-36으로부터 분리된 새로운 sulfotransferase는 생체내에서 간장의 효소에 못지않게 장내에서 phenol계 약물 및 담즙 배설되는 phenol성 화합물의 포함체 대사에 관여할 것으로 생각된다.

문 헌

- 1) Baumann, E.: Ueber gepaarte Schwefelsaurem im Organisms. *Pflugers Arch. Gesamte Physiol.*, **13**, 285 (1876).
- 2) Dodgson, K.S. and Tudball, N.: The metaboite of the sulfate group of potassium p-nitrophenyl (³⁵S) sulfate. *Biochem. J.*, **74**, 154 (1960).
- 3) Banerjee, R.K. and Roy, A.B.: The sulfotransferase of guinea pig liver. *Mol. Pharmacol.*, **2**, 56 (1966).
- 4) Baranczyk-Kuzma, A. and Szymc, T.: Lung phenol-sulfotransferase-thermal stability of human and bovine enzymes. *Biochem. Pharmacol.*, **35**, 995 (1986).
- 5) Anderson, R.J. and Weinshilboum, R.W.: Phenol sulfotransferase: Enzyme activity and endogenous inhibitors in the human erythrocytes. *J. Lab. Clin. Med.*, **94**, 158 (1979).
- 6) Roy, A.B.: *Sulfotransferases (Sulfation of Drugs and Related Compounds)*, CRC Press p.131 (1981).
- 7) Jakoby, W.B., Sekura, R.D., Lyon, E.S., Marrous, C.J. and Wang, J.L.: *Sulfotransferases (Enzymatic Basis of Detoxification)*, Vol. 2, Academic Press, p. 199 (1980).
- 8) Powell, G.M., Miller, J.J., Olavesen, A.H. and Curtis, C.G.: Liver as the organ of detoxification of phenol. *Nature* **252**, 234 (1974).
- 9) Mitsuoka, T.: The mmethod of screening for intestinal flora. *J. Japan Infect. Dis.*, **45**, 406 (1971).
- 10) Kim, D.H., Konishi, L. and Kobashi, K.: Purification, characterization and reaction mechanism of novel sulfotransferase obtained from an anaerobic bacterium of human intestine. *Biochim. Biophys. Acta*, **872**, 34 (1986).
- 11) Kobashi, K. and Kim, D.H.: A novel sulotransferase sulfates tyrosine-containing peptides and proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **140**, 38 (1986).
- 12) Kim, D.H. and Kobashi, K.: The role of intestinal flora in the metabolism of phenylsulfate esters. *Biochem. Pharmacol.*, **30**, 350 (1986).
- 13) Kim, D.H.: Detection of novel sulfotransferase-producing colonies. *Bulletin of K.-H. Pharm. Soc.*, **18**, 7 (1990).
- 14) Kreig, N.R. and Holt, J.G.: *Bergey's Mannual of Systematic Bacteriology*, Williams & Wilkins, p.464 (1984-1989).
- 15) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).