

## 항 결핵제, 리팜피신에 내성인 유산균의 개발

이 승 회 · 최 응 칠 · 김 병 각

서울대학교 약학대학

(Received November 8, 1988)

### Development of *Lactobacillus casei* Resistant to Rifampicin, an Antituberculosis Agent

Seung-Hee<sup>1</sup> Lee, Eung-Chil Choi and Byong Kak Kim

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

**Abstract**—*Lactobacillus casei* was treated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(NTG) to obtain resistant mutants to rifampicin. Freshly grown cells of the strain suspended in tris-maleic acid buffer were exposed to NTG of 50 $\mu$ g/ml for 30min. Five colonies of the NTG-induced mutants showed distinct resistance to rifampicin. They also exhibited identical characteristics with the original *Lactobacillus casei* when they were tested for growth, titrable acidity and sugar fermentation. It is suggested that they can be utilized as efficient starter cultures for fermented milk.

1908년에 Metchnicoff가 유산균을 장내에 투여함으로써 사람이 장수할 수 있다고 역설한 이래 유산균을 이용한 제제는 우유단백질의 소화율을 높이고 장내 유용균의 증식을 촉진하고, 변비를 개선하며, cholesterol의 흡수를 억제함으로써 심장병, 담석, 비만, 당뇨병 등을 예방하는 영양적 효과<sup>1-3)</sup>와 장내 균총 개선과 부패세균 및 병원성 세균의 이상발육억제 효과<sup>4-8)</sup>로서 오래전부터 널리 사용되어져 왔으며, 최근에는 항암작용에 대한 효과까지 보고되어 유산균에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다.<sup>9-10)</sup> 또한 사람의 장내 균총을 구성하는 주요 균인 유산균 제제는 항생제 및 항결핵제를 장기 복용할 때 병용 복용하여 이들 항생제로 인하여 장내 균총이 파괴되어 설사 및 내성균의 출현으로 유발되는 치명적 감염 등의 부작용을 감소시키도록 권장되고 있다.<sup>11)</sup> 그러나 이때 사용되는 항결핵제 및 항생제가 정상 균총의 주요균인 유산균까지 사멸시킨다면 유산균 제제의 병용 복용 효과가 없게 된다. 본 연구자는 시판중인 유산균 음료 또는 유산균 제제로부터 *Lactobacillus*속

세균을 분리하여 9종의 항결핵제 및 18종의 항생제에 대한 내성을 검토한 결과 항결핵제 경우에 있어서는 rifampicin과 ethambutol에 대해서만 특이적으로 감수성을 나타내었고 penicillin계, cephalosporin계 및 기타 항생물질의 경우는 상당수에 감수성을 나타냄이 밝혀졌다.<sup>12)</sup>

이에 연구자는 이들 항생제 및 항결핵제에 감수성인 균주를 내성균주로 변이시키는 것이 필요하다고 생각하고 특히 rifampicin이 항결핵제<sup>13-15)</sup>로서 널리 사용되고 장기간 복용해야 하는 약제임을 감안하여 먼저 rifampicin에 내성인 변이균주 개발에 착수하였다. 변이균주 개발에는 자외선, X선,  $\gamma$ 선 등의 조사방법과 여러가지 변이 유기제로 처리하는 방법이 있으나 Jenkins<sup>16)</sup>는 이러한 변이균주 개발방법 중에서 자외선, X선,  $\gamma$ 선 조사방법에 비해 변이 유기제 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine을 처리하는 것이 온도 감수성 유기물면에서 좋은 결과를 나타낸다고 보고 하였고, Adelberg 등<sup>17)</sup>은 *E. coli*에 NTG 100 $\mu$ g/ml를 15~30분간 처리하여 가장 많은 수의 돌연변이 균주를 얻었다고

보고하였다. 이에 본 실험에서도 형질 변이를 유발하는 변이 유기체 NTG(50 $\mu$ g/ml)를 30분 동안 처리하여 rifampicin에 내성인 돌연변이 균주를 다수 분리하였으며, 또한 이들 분리된 내성균주가 parent균주가 갖고 있는 유산균으로서의 특징을 갖고 있는가 여부를 검토함으로써 유산균 발효식품의 생산용 균주 또는 의약품 유산균제제의 생산균주로서 개발 가능성이 있는가를 알아보았다.

### 실 험 방 법

**시험균주**—시판중인 유산균 발효유(한국 야쿠르트유업사 제품, 야쿠르트)에서 *Lactobacillus casei*를 분리하여 시험균주로 사용했다.

**배지**—*Lactobacillus*속 세균의 분리 및 보존에는 MRS 한천배지를 사용하고 MIC 측정과 NTG 처리, ethidium bromide 처리에서는 MRS broth를 사용했다. 유산균 생균수 측정에는 Bromo Cresol Purple 한천배지를 사용하고 *Escherichia coli* 생균수 측정에는 Eosin Methylene Blue 한천배지를 사용했다. 유산균의 당 발효 시험에는 I.L.S. 배지를 사용하였으며(glucose 제외) 유산균의 생육 시험에는 10% skim milk를 사용했다. 각 배지의 조성표는 Table I과 같다.

**시험균의 분리**—시판중인 발효유 1ml를 취하여 1% peptone수로 10<sup>-2</sup>으로 희석시키고 다시 1ml를 취하여 10<sup>-2</sup>으로 희석시켰다. 이 조작을 한번 더 반복하여 10<sup>-6</sup> 희석액을 만들어 1ml 취

하여 Petri dish에 넣고 MRS agar 배지를 멸균 후 45°C로 냉각시켜 20ml를 취하여 petri dish에 넣어 균액과 잘 혼합고시킨 다음 Petri dish를 뒤집어 놓고 37°C에서 48시간 배양하였다. 배양 후 생성된 독립집락을 백금선으로 취하여 MRS 배지로 된 agar tall에서 천차 배양하였다. 최소 저지농도 측정-분리된 *Lac.* 균주를 MRS 액체배지에서 흡광도가 0.3이 될때까지 배양한후 MRS broth로 희석한 것을(1:200) MIC 측정용 균액으로 했다. MIC 측정은 액체 2배 희석법을 사용하였다.

**NTG(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine)처리**—*Lac. casei*에 대한 NTG 처리는 Adelberg 등의 방법<sup>17)</sup>을 변형하여 실시하였다. *Lac.* 균주를 MRS broth에서 12시간 전배양한 후 다시 동일 배지에 접종해 8시간 배양해서 NTG 처리 균액으로 하였다. NTG는 50 $\mu$ g/ml 농도로(pH 7.0) 37°C에서 30분간 균체에 처리했다.

**Ethidium bromide처리**—각 돌연변이 균주를 MRS 액체 배지에서 흡광도(O.D.)가 0.3이 될 때까지 37°C에서 배양후 MRS 배지로 희석하여(10<sup>3</sup>~10<sup>4</sup> cells/ml) ethidium bromide 처리용 균액으로 했다. 처리 방법은 액체 2배 희석법(0.09~50 $\mu$ g/ml)으로 하였으며 curing agents로서의 농도 선택은 육안으로 보아 균의 성장이 거의 없는 농도를 택하였다. ethidium bromide로 처리한 각각의 돌연변이 균주 배양액을 1 $\times$ 10<sup>-6</sup>으로 희석하여 1ml를 취해 MRS 한천배지 19ml와

Table I—Compositions of media.

I.L.S.	medium(trypticase 10g, yeast extract 5g, tryptose 3g, dipotassium phosphate 3g, tween 80 1g, sodium acetate 1g, glucose 20g, cystein 0.2g, ammonium citrate 2g, magnesium sulfate 11.5g, ferrous sulfate 0.68g D.W.* 1,000ml pH : 6.8)
M.R.S.	medium(peptone 10.0g, beef extract 10g, yeast extract 5g, dextrose 20g, tween 80 1g, ammonium citrate 2g, sodium acetate 5g, magnesium sulfate 0.05g, dipotassium phosphate 2g, D.W.* 1,000ml pH : 6.5)
B.C.P.	Agar medium(yeast extract 2.5g, peptone 5g, glucose 1g, tween 80 1g, L-cystein 0.1g, bromocresol purple 0.04g, agar 15g D.W.* 1,000ml pH : 6.9)
E.M.B.	Agar medium(peptone 10g, lactose 5g, saccharose 5g, dipotassium phosphate 2g, agar 13.5g, eosin Y 0.4g, methylene blue 0.065g, D.W.* 1,000ml)

\* D.W.: Distilled water

Petri dish 상에서 혼합응고시켜 37°C에서 48시간 배양했다. 이때 생성된 집락을 각 돌연변이 균주에 대해 50개씩 취해 MRS broth에서 배양해 rifampicin 내성 소실여부 시험균액으로 했다. rifampicin을 각 농도별로(400, 100, 10, 1 µg/ml) 함유한 MRS 한천배지를 만들어 50개의 집락을 도말하고 MRS 한천배지로 2mm 두께로 증충한 후 37°C에서 48시간 배양 후 성장정도를 관찰하였다.

**내성유지 시험**—rifampicin을 각 농도별로(4000, 1000, 100, 10 µg/ml) 멸균증류수를 사용하여 조제하고 각각 2ml씩 취하여 MRS agar medium 18ml와 Petri dish 상에서 혼합응고시키고 농도별로 만들어진 plate에 돌연변이 균주액을 접종했다. MRS agar medium을 2mm 두께로 증충한 다음 37°C에서 48시간 배양 후 각각의 돌연변이 균주의 성장 여부를 관찰했다.

**생균수 측정**—10% skim milk에 *Lac.* 균주를 접종하여 37°C에서 4일간 배양하면서 1일 간격으로 sampling하여 시험균액을 멸균 증류수를 이용하여 10진 희석법으로 계단희석하여 1ml 취해 B.C.P. agar medium 19ml와 Petri dish 상에서 혼합응고시켜 37°C에서 48시간 배양 후 나타난 황색 colony 수를 계수하고 희석배수를 곱한 것을 시료 1ml중의 유산균수로 했다.

**산도 측정**—10% skim milk에 *Lac.* 균주를 접종하고 37°C에서 5일간 배양시키면서 1일 간격으로 sampling하여 검액(5ml)에 동량의 증류수를 첨가하여 희석한 후 1% 페놀프탈렌지시약 3~5방울 적하여 0.1N NaOH 용액으로 적정하고 유산(%)로 나타냈다.

**당발효 시험**—I.L.S. broth(당 glucose는 제외) 3ml에 지시약 phenol red(0.04%)를 소량 첨가하고 9종류의 당의 최종농도를 멸균 증류수를 사용하여 6%가 되도록 조제한 것을 1ml씩 분주하였다. 여기에 돌연변이 균체와 parent 균체를 1백균이씩 접종하였다. 37°C에서 48시간 배양시켜 지시약의 색 변화를 관찰하여 적색이면 음성으로, 황색이면 양성으로 판정하였다.

**대장균 생육억제 시험**—skim milk 3ml(pH 6.5)에 *Lac.* 균주(parent)와 *E. coli*(1:1)를 접종하

고 나머지 한 group은 *Lac.* 균주(내성균주)와 *E. coli*(1:1)를 접종하여 37°C에서 24시간 배양시키면서 3시간 간격으로 sample을 취하여 시간에 따른 *E. coli*의 생균수를 측정하였다. *E. coli*의 고정 증식배지로는 E.M.B. 한천배지를 사용하였다.

## 실 험 결 과

**돌연변이 내성균주의 분리**—시중 야쿠르트액에서 분리한 *Lac. casei* 균주를 NTG로 처리한 후, rifampicin(0~50 µg/ml gradient)을 함유한 MRS agar medium에서 48시간 37°C에서 배양시켜 고농도쪽에 생성된 독립된 colony 5개를 취해 다시 gradient MRS agar medium에 도말한 후 표면을 2mm 정도의 MRS agar medium으로 증충시킨 후 37°C에서 48시간 배양시켰다. 5개의 colony 모두가 gradient agar medium의 top concentration(50 µg/ml)에서도 성장함을 확인하고, 분리한 5종의 변이균주를 각각 *Lac. casei* rifampicin resistant 7, *Lac. casei* RR15, *Lac. casei* RR24, *Lac. casei* RR25, *Lac. casei* RR29으로 명명하였다.

**Rifampicin에 대한 내성유지 실험**—NTG에 의해 유도된 rifampicin 내성 돌연변이 균주들이 rifampicin에 대해 지속적으로 내성을 유지하는지, 그렇지 않으면 복귀변이에 의해 그 내성을 상실하는지를 조사하기 위하여 5종의 돌연변이 균주 분리 직후부터 4개월까지 1개월 간격으로 rifampicin에 대한 내성유지 시험을 하였다. Table II에 나타낸 것과 같이 5가지 돌연변이 균주가 4개월까지 rifampicin 최고농도 400 µg/ml 함유된 배지에서도 정상적인 성장을 나타냄으로써 복귀변이에 의해 rifampicin에 대한 내성을 상실할 가능성은 없을 것으로 추정할 수 있었다.

**프라스미드 제거 실험**—*Lac. casei*을 NTG 처리하여 분리한 돌연변이 내성균주 RR7, RR15, RR24, RR25, RR29의 rifampicin에 대한 내성이 프라스미드에 기인한 것인지 그렇지 않으면 염색체상의 변화에 의한 것인지를 확인하기 위하여 ethidium bromide로 처리한 후 rifampicin

**Table II**—Maintenance test for rifampicin resistance of NTG-induced mutants of *Lac. casei*.

Strain	Rif. conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	Subculture											
		One*			Two			Three			Four		
		400	100	10	400	100	10	400	100	10	400	100	10
<i>Lac. casei</i> (parent)		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
RR 7		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RR 15		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RR 24		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RR 25		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RR 29		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

— : No growth      + : growth      \* : month

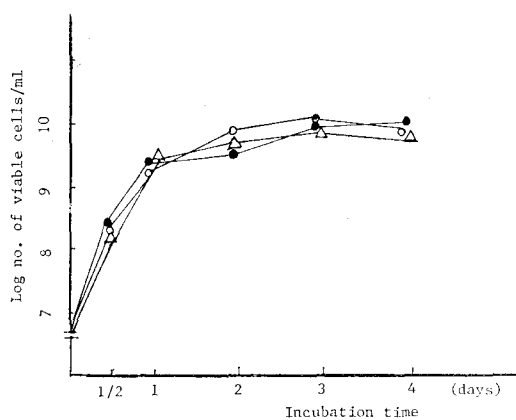
**Table III**—Elimination test for rifampicin resistance by ethidium bromide.

Strain	Con. of ethidium bromide ( $\mu\text{g/ml}$ )	No. of tested colonies	Con. of rifampicin ( $\mu\text{g/ml}$ )			No. of rifampicin sensitive colonies
			400	100	10	
RR 7	0.7	50	+	+	+	0
RR 15	3.12	50	+	+	+	0
RR 24	6.25	50	+	+	+	0
RR 25	0.35	50	+	+	+	0
RR 29	6.25	50	+	+	+	0

+ : growth      -- : no growth

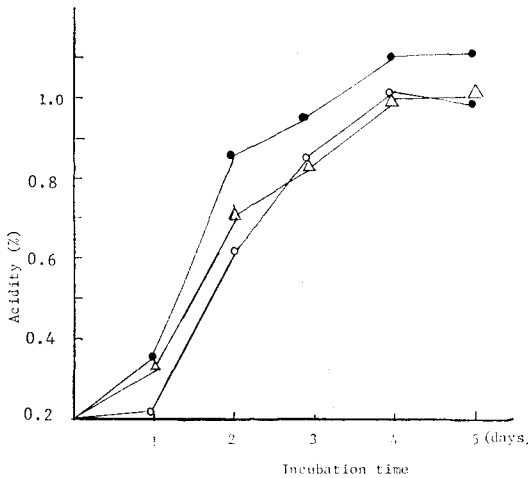
에 대한 내성의 소실여부를 관찰하였다. Table III에서 나타낸 것처럼 ethidium bromide 처리 후에도 돌연변이 내성균주 각각에서 유래한 independent colony 50개가 rifampicin 각 농도(400, 100, 10 $\mu\text{g/ml}$ )에서 정상적인 성장을 나타냄으로써 5종의 돌연변이 균주 RR7, RR15, RR24, RR25, RR29의 rifampicin 내성은 plasmid coded function이 아닌 것으로 판정되었다.

돌연변이 내성균주의 생육—NTG에 의해 유도된 rifampicin 내성 돌연변이 균주 RR7, RR15, RR24, RR25, RR29이 발효유의 종균으로서 사용되려면 우유 배지에서의 생육이 parent 균주 *Lac. casei*과 같아야 함으로 돌연변이 내성균주와 그 parent 균주의 생육 pattern을 비교해 보았다. *Lac. casei* parent는 접종 12시간 후에는 cell 수가  $5.4 \times 10^8/\text{ml}$ , 1일 후에는  $3.5 \times 10^9/\text{ml}$ , 2일 후에는  $9.0 \times 10^9/\text{ml}$ , 3일 후에는  $9.8 \times 10^9/\text{ml}$ , 4일 후에는  $6.7 \times 10^9/\text{ml}$ , 5일 후에는  $2.5 \times 10^9/\text{ml}$ 로 나타났다. rifampicin 내성 돌연변이 균주들도 10% skim milk에서의 생육 pattern이 *Lac.*

**Fig. 1**—Growth curves of *Lac. casei* parent and its NTG-induced mutants in skim milk.

△ : *Lac. casei* parent  
● : *Lac. casei* RR 7,  
○ : *Lac. casei* RR 15.

*casei* parent와 거의 유사하였다(Fig. 1). parent strain을 대조로 하여 전배양기간중에 있어서 유의차 검정을 한 결과, 1% 유의수준에서 유의차가 인정되지 않았다.



**Fig. 2**—Titrable acidity of *Lac. casei* parent and its NTG-induced mutants in skim milk.  
 △ : *Lac. casei* parent  
 ● : *Lac. casei* RR 7,  
 ○ : *Lac. casei* RR 15.

돌연변이 내성균주의 산 생성력—NTG에 의해 유도된 rifampicin 내성 돌연변이 균주 *Lac. casei* RR7, RR15, RR24, RR29을 유산균 발효 식품의 생산용 균주로 개발하기 위해 parent strain *Lac. casei*와 비교하여 산 생성력을 측정해 보았다(Fig. 2). parent strain과 돌연변이 내성균주의 산 생성력은 유사한 양상을 나타내었으며 특히 RR7은 그 parent strain보다 유산 생성력이 증가하였다.

돌연변이 내성균주의 당 발효 시험—NTG에

의해 유도된 rifampicin 내성 돌연변이 균주 *Lac. casei* RR7, RR15, RR24, RR25, RR29의 당 발효의 생화학적 성질을 parent strain *Lac. casei*와 비교하여 보았다.

Table IV에서 나타난 것처럼 *Lac. casei* parent는 raffinose와 rhamnose를 이용하지 못한 것으로 판명되었고 5종의 돌연변이 내성균주도 그 결과가 동일 하였다. 즉 돌연변이 내성균주의 당 발효 생리적 성질은 parent strain과 동일함을 알 수 있었다.

돌연변이 내성균주의 대장균에 대한 생육억제 시험—돌연변이 내성균주의 생육, 산 생성력, 당 발효실험 등을 한 결과 RR7이 생육과 당 발효에 있어서 그 parent strain과 동일하게 나타났고, 산 생성력이 parent strain보다 증가한 점에 착안하여 RR7를 발효유의 종균으로서의 개발 가능성을 검토하기 위해 *Lac. casei*의 특징적인 성격인 *E. coli* 생육억제에 대한 성격을 parent strain *Lac. casei*과 비교하여 검토해 보았다. Fig. 3에서 나타난 것처럼 *E. coli* 단독배양시는 3~15시간대에 cell수가 기하급수적으로 증가하는 반면 *Lac. casei* parent+*E. coli*, *Lac. casei* RR7+*E. coli* 혼합배양했을 경우는 3~6시간 대에서는 두 경우 모두 *E. coli*의 부분적 생육억제를 나타내었고, 6~15시간 대에서는 혼합배양한 group에서는 *E. coli*의 생육이 거의 완전히 억제됨으로써 RR7도 그 parent strain과 마찬가지로 *E. coli*의 생육을 억제하는 것으로 밝혀졌다.

**Table IV**—Sugar fermentation tests of *Lac. casei* parent and its NTG-induced mutants.

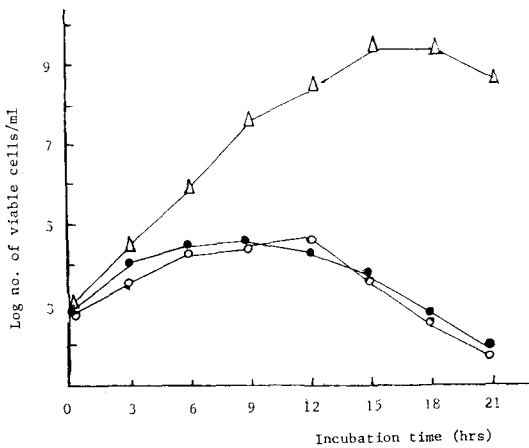
Sugar	Strain	<i>Lac. casei</i> Parent	PR 7	PR 15	PR 24	PR 25	PR 29
Dextrose		+	+	+	+	+	+
Fructose		+	+	+	+	+	+
Galactose		+	+	+	+	+	+
Raffinose		-	-	-	-	-	-
Rhamnose		-	-	-	-	-	-
Ribose		+	+	+	+	+	+
Saccharose		+	+	+	+	+	+
Maltose		+	+	+	+	+	+
Sorbitol		+	+	+	+	+	+

+ : Sugar was utilized.  
 - : Sugar was not utilized.

**Table V**—MIC of antituberculosis agents for *Lac. casei* parent and its NTG-induced mutants

Agents	Strain	<i>Lac. casei</i> Parent	RR 7	RR 15	RR 24	RR 25	RR 29
Streptomycin		25*	50	50	25	50	50
Kanamycin		100<	100<	100<	0.2	100<	100<
Rifampicin		0.09	100<	100<	100<	100<	100<
Ethambutol		100<	100<	100<	0.2	100<	100<
INAH		100<	100<	100<	0.8	100<	100<
Pyrazinamide		100<	100<	100<	0.2	100<	100<
Prothionamide		100<	100<	100<	0.4	100<	100<

\* :  $\mu\text{g/ml}$



**Fig. 3**—Changes in numbers of *Escherichia coli* which was grown with *Lactobacillus casei*.

- : *Lac. casei* parent + *E. coli*,
- : *Lac. casei* RR 7 + *E. coli*,
- △ : control (*E. coli*)

돌연변이 내성균주의 항결핵제에 대한 MIC 측정—NTG처리하기전의 *Lac. casei* parent strain과 NTG처리하여 분리한 rifampicin에 내성인 5종의 돌연변이 균주에 대하여 항결핵제에 대한 MIC 측정결과를 비교하여 나타내었다(Table V). *Lac. casei* parent strain이 rifampicin에 감수성인 반면 5종의 돌연변이 균주들은 목적인 바 대로 rifampicin에 대해 내성을 획득했으며 나머지 7종의 항결핵제에 대해서는 내성을 유지하고 있었다. RR24는 rifampicin에 대해서는 목적인 바 대로 내성을 획득했으나 다른 항결핵제에 대해서는 감수성인 것으로 나타났다.

**고 찰**

*Lactobacilli*의 발효유 사용에 있어서 acid production, flavor development 등은 비교적 많은 연구가 되어 있고<sup>18,19)</sup>, human oral cavity에서 분리한 *Lac. casei*와 non-oral clinical isolate로서 *Lac. casei*의 각종 항생제에 대한 MIC 측정 결과는 이미 보고된 바가 있으나 유산균 제제와 항생제와의 병용효과를 고려하여 어떤 특정 항생제에 대한 내성을 유발시킨 NTG-induced mutants에 대한 연구 보고는 없었으므로 이에 본 실험에서는 *Lac. casei*을 NTG 처리하여 (50  $\mu\text{g/ml}$ , 30min) rifampicin에 내성을 가진 돌연변이 균주 5가지를 분리하였다.

이들 돌연변이 내성균주 *Lac. casei* RR7, RR15, RR24, RR25, RR29을 NTG처리 하기전의 parent strain과 비교하여 항결핵제에 대해 MIC 측정한 결과 항결핵제 rifampicin에 대해서는 parent strain이 강한 감수성(MIC 0.09 $\mu\text{g/ml}$ )을 나타낸 반면, 5종의 돌연변이 균주들은 목적인 바 대로 내성을 나타내었고(MIC 100 $\mu\text{g/ml}$ ) 이들 돌연변이 내성균주의 나머지 7종의 항생제에 대한 내성은 parent strain과 동일하게 유지되고 있었다.

이들 5종의 돌연변이 균주의 내성 지속성 여부를 검사하기 위해 분리 직후부터 4개월까지 1개월 간격으로 내성유지 시험을 한 결과 5종의 돌연변이 균주 전체가 분리 후 4개월까지 rifampicin 최고농도 400 $\mu\text{g/ml}$  함유한 배지에서도 정

상적인 성장 pattern을 나타내었으므로 복귀변이에 의한 돌연변이 균주의 rifampicin내성소실 가능성은 없을 것이라고 추정된다.

또한, NTC에 의해 유도된 돌연변이 균주의 rifampicin에 대한 내성이 plasmid-coded function 인지를 조사하기 위해 각 돌연변이 균주를 ethidium bromide로 처리하여 plasmid curing을 시도한 결과, 각 돌연변이 균주에서 유래한 50개의 colony 모두가 ethidium bromide 처리 후에도 rifampicin에 대한 내성을 소실하지 않음으로써, rifampicin에 대한 내성은 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosopguanidine(NTG)에 의해 chromosomal mutation이 유발된 것이라고 사료된다. rifampicin에 내성을 획득한 5종의 돌연변이 균주들이 milk based foods의 제조에 있어서 starter로서 사용될 수 있는지를 시험하기 위하여 parent strain과 비교하여 생육력, 산 생성능, 당 발효 실험을 시험해 본 결과 5종의 돌연변이 균주의 생육은 그 parent strain과 동일한 생육력을 나타내었으며, 당 발효의 생화학적 특성도 동일한 것으로 밝혀졌다. 산 생성능에서는 RR15, RR24, RR29과 *Lac. casei* parent strain이 유사한 산 생성능을 보였으며, RR24의 경우는 parent strain보다 다소 산 생성력이 감소된 것으로 나타났다. 또한, parent strain의 4일 평균 산 생성능이 0.7%인 것에 비해 돌연변이 균주 RR7의 4일 평균 산 생성능은 0.9%를 나타내었으므로 RR7은 NTG에 의해 유도된 돌연변이 균주로서 산 생성력이 증가되었음을 알 수 있다.

이 결과는 *Lac. casei*의 NTG에 의해 유도된 돌연변이 균주가 그 parent culture의 비교할 때 산 생성능, volatile acidity, proteolytic activity가 증가했다는 보고와 일치한다.<sup>20,21)</sup>

NTG에 의해 유도된 돌연변이 균주 중에서 RR7의 산 생성력이 parent strain보다 증가한 것을 근거로 하여 이 균주의 유산균 발효식품의 생산용 균주로서의 가능성을 검토하기 위해 Lactic acid bacteria의 특징적인 성격인 장내 세균인 *E. coli* 생육억제 효과에 대한 실험을 한 결과 RR7은 parent strain과 마찬가지로 *E. coli* 생육을 우수하게 억제하는 것으로 나타났다. 그

때로 5종의 돌연변이 균주 RR7, RR15, RR24, RR25, RR29가 모두 milk-based foods의 starter로서 개발 가능성이 있으나 특히 산 생성력 높은 RR7은 rifampicin에 대한 내성기전을 이미 알려진 기전과 비교 검토하는 것과 동시에, 돌연변이에 따른 영양소 요구변화 연구를 병행하여 그 실용면에서 개발 가능성이 클 것으로 기대된다.

## 결 론

시판중인 유산균 발효유에서 *Lactobacillus casei* 균주를 분리하여, 그 균주를 돌연변이원으로 처리함으로써 결핵치료제인 rifampicin에 내성인 내성 균주를 얻었다. 이 내성균주들이 유산균의 갖는 본래의 특징(산 생성, 당 발효, 대장균 성장억제 등)을 유지하고 있었으며, 제품 생산 균주로서 이용성이 인정되었다. 이런 균주를 이용하여 생산된 제품은 rifampicin을 복용하는 결핵 환자가 복용한다면 치료에 큰 도움을 받을 수 있다.

## 감사의 말씀

본 연구는 서울대학교 약학대학의 약학연구재단의 지원에 의하여 이루어진 것이다. 동 재단에 감사의 뜻을 표한다.

## 문 헌

- 1) Fykw, A. and Mayer, J.B.: *Kinder Helik* 61, 461 (1959).
- 2) Schroeder, K.: *Nord. Med.* 30, 935 (1946).
- 3) Lachner, O. and Breler, A.: *Dairy Sci. Abst.* 25, 1953 (1963).
- 4) Haenell, H.: *Amer. J. Clin. Nutrition* 23, 1443 (1973).
- 5) Shahani, K.M. and Chandan, R.C.: *J. Dairy Sci.* 62, 1685 (1979).
- 6) Dahiya, R.S. and Speck, M.L.: *J. Dairy, Sci.* 51, 1968 (1968).
- 7) Kon, S.K.: *FAO Nutrition Studies* 27, FAO

- Rome (1972).
- 8) Shirata, M.: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 1, 115 (1973).
  - 9) Goldin, B.R. and Gordach, S.L.J.: *Natl. Cancer Inst.* 57, 371 (1976).
  - 10) Armstrong, B.: *Intl. J. Cancer* 15, 617 (1975).
  - 11) Gordon, D. and Macrae, J.: *The Lancet* 11, 1106 (1956).
  - 12) 김정우, 김형수, 이승희, 최응철, 김병각 : 약학회지 29, 159 (1985).
  - 13) Hobby, G.L. and Lenert, T.F.: *J. Amer. Rev. Resp. Dis.* 99, 453 (1969).
  - 14) Canetti, G. and Lelirzin, M.: *Tubercle* 49, 367 (1968).
  - 15) De Mattia, R.: *Minerva Med.* 60, 4781 (1969).
  - 16) Jenkins, B.: *Genetics*, Houghton Mifflin Co. 352 (1975).
  - 17) Adelberg, E.A. and Mandell, M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 18, 788 (1965).
  - 18) Franklin, J.B.S. and Sharpe, M.F.: *J. Dairy Res.* 30, 87 (1963).
  - 19) Marth, E.H.: *J. Dairy Sci.* 45, 1271 (1962).
  - 20) Singh, J. and Ranganathan, B.: *Folia Microbiol.* 23, 82 (1978).
  - 21) Singh, J. and Ranganathan, B.: *J. Food Protection* 40, 600 (1977).