

리팜피신에 내성인 *Bifidobacterium bifidum* 균주개발

최용칠* · 고성열 · 김희선 · 최성숙 · 김숙경 · 김병각
서울대학교 약학대학

(Received September 6, 1993)

Development of *Bifidobacterium bifidum* Strains Resistant to Rifampicin

Eung-Chil Choi[#], Sung-Youl Ko, Hee-Sun Kim, Sung-Sook Choi
Sook-Kyung Kim and Byong-Kak Kim
College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract—*Bifidobacterium bifidum*, one strain of medical preparations being on the market for human intestinal disorder, is very sensitive to rifampicin. If this preparation is taken with rifampicin, its therapeutic effect can't be expected. To develop rifampicin resistant mutants, *B. bifidum* was treated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG). All of thirty strains grown on the plates containing 10 µg/ml rifampicin were over 1,000 times more resistant to rifampicin than parental strain and they were identified as *B. bifidum* by fructose-6-phosphoate phosphoketolase test. Three strains out of thirty, which produced almost same amount of organic acid as parental strain, were selected for further studies. They showed identical growth inhibition activity against *E. coli* compared with that of parental strain. And rifampicin was not inactivated.

Keywords □ *Bifidobacterium bifidum*, Rifampicin, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG), Fructose-6-phosphate phosphoketolase, Resistance.

세계보건기구(World Health Organization, WHO)의 보고에 따르면, 세계 인구의 약 1/3이 *Mycobacterium tuberculosis*에 감염되어 있다.¹⁾ 지난 10년간 전 세계적으로 해마다 평균 25만명에서 320만 명의 결핵환자가 보고되어 왔다. 1990년에는 세계적으로 800만 명의 결핵 환자가 발생하였고, 260만 명에서 290만 명이 결핵으로 사망하였다. 우리나라에서도 1985년 현재 798,000명의 결핵환자가 있다고 보고되었다.²⁾

나병은 *Mycobacterium leprae*의 감염에 의해 일어나는 질환으로 아직까지 아프리카, 아시아, 라틴 아메리카의 많은 나라들에서 주요한 공중보건 문제로 남아 있다. 1992년 2월까지의 WHO통계에 따르면, WHO에 등록된 총 나병 환자수는 3,087,788명으로 이는 1990년 10월의 3,737,375명에 비해 17.4%의 감

소를 보였다.³⁾ 이런 감소는 1980년대 초에 도입된 다약제 치료법(multidrug therapy, MDT)도입의 결과이다.

결핵환자 및 나병환자가 항결핵제(또는 항나병제)를 장기 복용하는 경우에는 장내 정상세균총이 파괴되어 흡수부전, 소화불량 등 장 질환⁴⁾을 일으킬 수 있으므로, 항결핵제와 정장용 생균 제제를 병용하는 것이 바람직하다고 Shapiro⁵⁾, Nechetes⁶⁾등이 보고한 바 있다. 그런데, 이때 사용되는 항결핵제가 정장 균주를 사멸시키거나 정장 균주가 항결핵제를 불활성화 시키게 되면 정장제 의미가 없게 된다.

따라서 본 연구에서는 현재 국내에서 시판되고 있는 정장용 생균 제제에 포함되어 있는 정장 균주의 하나인 *Bifidobacterium bifidum*을 항결핵제에 내성을 갖는 균주로 돌연변이시켜 결핵 및 나병환자의 장내

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

질환을 치료 또는 개선시킬 수 있는 정상균주를 개발하고자 하였다.

본 실험에 사용한 *B. bifidum*은 소장 하부에서 대장에 주로 작용하는 정상균주로 유산이외에 초산도 생산하여 유해균 증식 억제작용⁷⁾과 더불어 장관 연동을 적당한 정도로 촉진시키거나 변(便)을 연화시키는 작용을 갖고 있다. 또, macrophage의 활성을 높여 대장균 등의 Gram(-)균의 발육을 억제한다.⁸⁾

본 실험에 앞서 *B. bifidum*에 대한 7종의 항결핵제의 최소 저지농도(MIC)를 측정하여 감수성 여부를 검토한 결과 리팜피신에 대해서만 특이적으로 감수성을 나타냈다.

그래서, *B. bifidum* 모균주에 대해 돌연변이를 유발시켜 리팜피신에 내성인 균주를 얻고자 하였다. 돌연변이 균주 개발에는 자외선, X선, γ 선 등의 조사방법과 여러가지 변이 유도제로 처리하는 방법이 있으나, John⁹⁾등은 이러한 돌연변이 균주개발 방법 중에서 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)로 처리하는 것이 매우 높은 효율을 나타낸다고 보고하였다. 또한 Adelberg¹⁰⁾등은 MNNG로 *Escherichia coli*를 처리하여 돌연변이시킬 때의 최적 조건에 대하여 보고하였고, Schwartz,¹¹⁾ 등도 이 방법을 이용하여 실험한 것을 보고한 바 있다.

따라서 MNNG처리에 의한 돌연변이 방법에 의해 리팜피신 내성 돌연변이 균주를 분리하고, 이들에 대해 정상용 생균 제제로서의 개발 가능성을 검토해 보기 위하여 산 생성능, *E. coli* 생육억제능 등의 생화학적 특성¹²⁾을 *B. bifidum* 모균주와 비교, 검토하였다. 또한, 리팜피신이 불활성화 된다면 치료 목적을 달성할 수 없으므로 *in vitro* 실험을 통해 그 가능성을 알아보았다.

실험재료 및 방법

시험균주—본 실험에서는 일동제약에서 분양받은 *Bifidobacterium bifidum*을 사용하였다. 그 외의 사용 균주로는 본 연구실에서 보관하고 있는 *Escherichia coli* NM522, *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Serratia marcescens* ATCC27117을 사용하였다.

배지—*B. bifidum* 생육 배지로는 Bacto-liver broth (BL-broth)를 사용하였고, 보관용 배지로는 Skim milk

broth를 사용하였다. 리팜피신 불활성화 실험시 *B. bifidum* ATCC6633의 배양 배지로는 Mueller-Hinton medium(MH medium, Difco Co.)을 사용하였다.

최소 저지농도(MIC)의 측정—본 실험에서는 항결핵제로 리팜피신, kanamycin, INAH, ethambutol, pyrazinamide, D-cycloserine, ofloxacin을 사용하였다. 사용균액은 BL-broth에서 40°C 하룻밤 전 배양한 균액을 BL-broth로 10⁶ cell/ml이 되도록 희석하였다.

MIC측정은 액체 배지 희석법을 실시하였다. 항결핵제가 함유된 배지는 최고 농도를 400 μ g/ml로 하여 13단계 농도계열을 2배 희석법으로 만들었다(돌연변이 균주의 경우에는 최고농도를 800 μ g/ml로 하였다). 희석한 균액 5 μ l를 항결핵제가 함유된 액체 배지에 접종하였다. 40°C에서 18~20시간 배양한 후 균의 성장을 관찰할 수 없는 최소 농도를 MIC로 하였다.

MNNG처리와 내성 균주의 선별¹³⁾—Skim milk broth에 보관하고 있는 *B. bifidum* 모균주를 40°C에서 하룻밤 전 배양한 후 새배지에 접종하여 40°C, 5시간 배양하였다. 배양액을 3,000 xg에서 5분간 원심분리하여 상등액을 버리고 50 mM pot. phosphate buffer (pH 6.8)로 세척한 후, 50 mM pot. phosphate buffer (pH 6.8)에 현탁시켰다. 용시 제조한 MNNG용액을 50 μ g/ml과 100 μ g/ml이 되도록 가하였다. 이때, 대조군에는 MNNG를 가하지 않고 50 mM pot. phosphate buffer(pH 6.8)에 현탁만 시켰다. 40°C에서 30분, 60분 그리고 120분 배양하여 돌연변이 반응을 일으켰다. 3,000 xg에서 5분간 원심분리하고 50 mM pot. phosphate buffer(pH 6.8)로 세척한 후, 새로운 BL-broth에 현탁시켰다. 현탁한 리팜피신이 10 μ g/ml 함유된 용용 BL-medium에 가하고, petri dish에 부은 후, 40°C에서 3일간 혐기성 배양하여 돌연변이 집락의 형성을 관찰하였다.

***B. bifidum*의 동정**¹⁴⁾—*B. bifidum*의 동정을 위하여 fructose-6-phosphate phosphoketolase test를 실시하였다. 전 배양한 시험 균주를 BL-broth 20 ml에서 40°C, 하룻밤 배양하여 원심분리하고 cell pellet을 50 mM pot. phosphate buffer(pH 6.5)로 두번 세척 후 같은 buffer 1 ml를 취하여, NaF와 sod. iodoacetate가 함유된 용액과 기질인 fructose-6-phosphate를 각각 25 μ l씩 가한 후, 37°C에서 30분간 반응시켰다. Hydroxylamine 150 μ l를 가하여 반응을 정지시킨 후, 실

온에서 10분간 방치하였다. Trichloroacetic acid 용액과 4 N HCl을 각각 100 μ l씩 가한 후, FeCl₃를 가하여 반응액의 색 변화를 관찰하였다. 이때, 반응액이 색의 적자색으로 변하면 양성 결과이다. 색 비교를 위한 대조로는 fructose-6-phosphate를 넣어 주지 않은 반응액을 이용하였다.

산도정량—40°C에서 하룻밤 전 배양한 모균주와 돌연변이 균주를 새로운 BL-broth에 2.5% 접종하고 40°C, 24시간 배양하였다. 배양액을 3,000 xg에서 5분간 원심분리한 후 얻은 상등액을 멸균증류수로 5배 희석하여 1% phenolphthalein용액 2방울을 넣고, 0.1 N NaOH용액으로 중화 적정하였다.

E. coli 생육억제 시험—*B. bifidum* 모균주와 돌연변이 균주들을 40°C에서 하룻밤 전 배양한 후, 원심분리하여 상등액을 얻었다. 이 상등액과 새로운 BL-broth를 각각 1:1과 1:3의 비율로 혼합하여 *E. coli* 생육억제 시험용 배지를 만들었다. 여기에 37°C, 하룻밤 전 배양한 *E. coli* NM522균주를 2.5% 접종하였다. 한 시간 간격으로 8시간 동안 일정량을 취하여 600 nm에서 흡광도를 측정하여 *E. coli* NM522의 생육억제를 관찰하였다. 이때 대조군으로는 *B. bifidum* 배양 상등액을 넣지 않은 BL-broth에서 키운 *E. coli* NM522 배양액을 사용하였다. 또, *E. coli*의 생육억제가 pH의 저하에 의해서만 일어나는지를 알아보기 위하여 BL-broth제조시 pH를 5.72와 4.92로 맞추어 준 배지에서 키운 *E. coli* NM522의 성장도도 측정하였다.

내성균주에 의한 리팜피신의 불활성화 가능성에 대한 시험—40°C, 하룻밤 전 배양한 내성 균주들의 배양액을 리팜피신이 100 μ g/ml 함유된 BL-broth에서 하룻밤 배양하였다. 배양액을 원심분리하여 얻은 상등액에 존재하는 리팜피신을 chloroform으로 추출하였다. 추출액으로 10 μ g/disc농도의 리팜피신 디스크를 만들어 리팜피신의 역가 검정에 쓰이는 *B. subtilis* ATCC6633균주 평판위에 놓아 고정시킨 후 배양하였다. 이때 생긴 저지원의 크기를 표준 검량 곡선에 나타난 리팜피신 10 μ g/disc의 저지원의 크기와 비교하여 불활성화 여부를 확인하였다. 이때, 대조군으로는 리팜피신에 비감수성인 *Serratia marcescens* ATCC 27117 균주를 사용하였다.

실험결과

***B. bifidum* 모균주에 대한 항 결핵제의 MIC**—7종의 항결핵제의 *B. bifidum* 모균주에 대한 최소저지농도는 Table I에 나타내었다. *B. bifidum* 모균주는 리팜피신과 ofloxacin 이외의 5종의 항결핵제에 대하여 내성을, ofloxacin에 대하여서는 약한 감수성을 나타내었고 리팜피신에는 MIC가 0.78 μ g/ml로 감수성을 나타내었다.

내성 균주의 분리—*B. bifidum* 모균주를 MNNG 처리하여 리팜피신이 10 μ g/ml 함유된 고체 배지에서 배양한 결과, MNNG 50 μ g/ml의 농도에서 30분 처리한 2평판, 60분 처리한 1평판과 MNNG 100 μ g/ml의 농도에서 30분 처리한 2평판, 60분 처리한 1평판에서 리팜피신 내성 집락들이 형성되었다. 이들 6개 평판에서 각각 5 집락들씩을 취하여 이들을 *B. bifidum* RFR11, RFR12, ..., RFR65로 명명하였다.

리팜피신 내성균주들에 대한 리팜피신의 MIC—선발된 돌연변이 균주 30종에 대하여 MIC를 측정할 결과, MIC가 800 μ g/ml인 것이 23종, 800 μ g/ml 이상인 것이 7종으로 1,000배 이상 내성이 상승하였다 (Table II).

***B. bifidum*의 동정**—선발된 돌연변이 균주들이 *Bi-*

Table I—Antimicrobial activity of antituberculosis agents against *Bifidobacterium bifidum*

Antituberculosis agents	MIC(μ g/ml)
Rifampicin	0.78
Kanamycin	400
INAH	>400
Ethambutol	50
Pyrazinamide	200
D-Cycloserine	100
Ofloxacin	12.5

Table II—Antimicrobial activity of rifampicin against MNNG induced mutants of *Bifidobacterium bifidum*

MIC(μ g/ml)	Mutant
800	RFR 11,12,13,14,15,21,22,23,41,42,43,44,45,51,52,53,54,55,61,62,63,64,65
>800	RFR 24,25,31,32,33,34,35

fidoceterium 인지를 확인하기 위하여 *Bifidoceterium*의 대사과정 중 특이하게 생성되는 fructose-6-phosphate phosphoketolase에 대한 시험을 실시하였다. 그 결과, 돌연변이 균주 30종들과 모균주 모두 양성 결과인 적자색을 나타내었다.

산도정량—모균주 및 30종의 돌연변이 균주에 의하여 생산되는 유기산량을 측정, 비교한 결과, 모든 돌연변이 균주가 모균주와 비교하여 유산 생성량이 약간 낮기는 하였으나, 비슷한 생성량을 보였다. 이들 중 유산 생성량이 모균주와 가장 비슷한 3균주, 즉 RFR11, RFR21, RFR61을 다음의 실험들을 위하여 선발하였다(Table III).

E. coli생육 억제—*B. bifidum*과 *E. coli*를 동시에 배양할 수 없었기 때문에, *B. bifidum*을 키운 배양 상등액을 1/4, 1/2 양씩을 함유한 배에 *E. coli* NM522를 접종하여 생육 억제시험을 실시하였다. Fig. 1과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 *B. bifidum* 모균주와 돌연변이 균주의 배양액 1/4양을 함유한 배지에서 배양시킨 *E. coli*를 보면 600~1,100배로 성장이 감소하였고, 1/2양을 함유한 배지에서 배양시킨 *E. coli*는 거의 성장을 보이지 않았다. *E. coli*성장 억제를 시간별로 보면 균의 성장이 성장초기부터 현저히 억제됨을 알 수 있었다. 또, *B. bifidum*배양 상등액을 1/4양 넣어줄 때와 동일하게 pH를 5.72로 맞추고, 1/2양 넣어줄 때와 동일하게 pH를 4.92로 맞추어준 후 *E. coli*의 성장을 관찰해 본 결과 각각 400~600배, 900~1,100배 정도 성장이 억제됨을 알 수 있었다.

내성균주의 리팜피신 내성유지—리팜피신 내성 돌연변이 균주를 8개월 동안 약 2주에 한번씩 계대하여 MIC를 측정하여 본 결과, MIC가 모두 800 µg/ml로 내성이 유지됨을 알 수 있었다(Table IV).

내성 균주에 의한 리팜피신의 불활성화 가능성—

Table III—The amounts of lactic acid produced by *Bifidobacterium bifidum* parent and its mutants

Strain	Concentration(mg/ml)
Parent	10.36(100%)
RFR 11	9.01(86.96%)
RFR 21	9.01(86.96%)
RFR 61	9.01(86.96%)

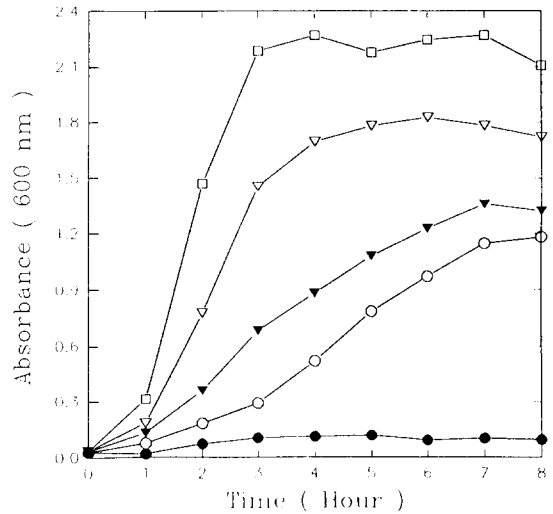


Fig. 1—Changes in the growth of *E. coli* in the cultivated medium of *Bifidobacterium bifidum* parent. ○ 1/4 vol. of culture broth of *B. bifidum* parent ● 1/2 vol. of culture broth of *B. bifidum* parent ▽ *E. coli* NM522 (pH 5.72) ▼ *E. coli* NM522 (pH 4.92) □ *E. coli* NM522

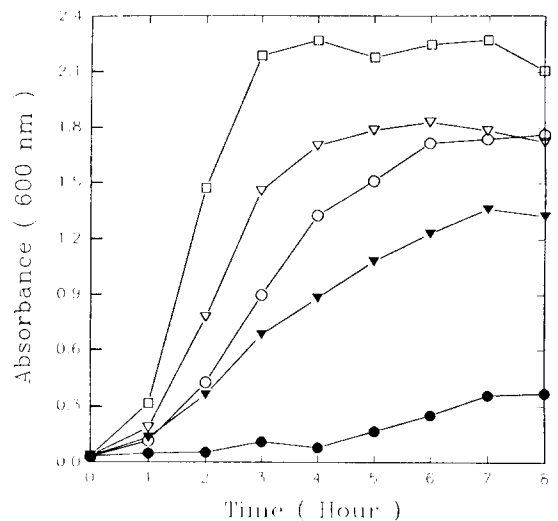


Fig. 2—Changes in the growth of *E. coli* in the cultivated medium of *Bifidobacterium bifidum* RFR11. ○ 1/4 vol. of culture broth of *B. bifidum* RFR11 ● 1/2 vol. of culture broth of *B. bifidum* RFR11 ▽ *E. coli* NM522 (pH 5.72) ▼ *E. coli* NM522 (pH 4.92) □ *E. coli* NM522

Table IV—Maintenance test for rifampicin resistance of *Bifidobacterium bifidum*

Subculture Strain	0	1 st	2 nd	3 rd	4 th-11 th	after 8 months (MIC:µg/ml)
Parent	0.78	-	-	-	-	-(0.78)
RFR 11	800	+	+	+	+	+(800)
RFR 21	800	+	+	+	+	+(800)
RFR 61	800	+	+	+	+	+(800)

Table V—The possibility of *in vitro* inactivation of rifampicin by culture of rifampicin resistant mutants of *Bifidobacterium bifidum*

Strain	Inhibition zone(mm)*	Inactivation
Standard**	13	No
Control***	11.7	No
RFR 11	10.8	No
RFR 21	11.7	No
RFR 61	12.3	No

* The size of inhibition zone against *B. subtilis* ATCC 6633 by rifampicin extracted from the filtered culture of rifampicin resistant mutants of *Bifidobacterium bifidum*

** Standard inhibition zone by disc containing 10 µg/disc rifampicin

*** Strain : *Serratia marcescens*

리팜피신에 내성인 *B. bifidum* RFR11, RFR21 그리고 RFR61을 리팜피신이 100 µg/ml로 함유된 배지에서 배양 후 배양액 중에 남아있는 리팜피신의 활성을 측정하여 불활성화 여부를 검토하였다. Table V에서 보는 바와같이 내성균 배양액에서 남은 리팜피신에 의해 생긴 저지원의 크기가 대조균의 배양액에서 리팜피신에 의해 생긴 저지원의 크기, 디스크의 저지원의 크기와 큰 차이가 없었다. 따라서, 내성균에 의해 리팜피신이 불활성화 되지는 않는다고 여겨진다.

고 찰

6종의 항결핵제의 *B. bifidum*에 대하여 최소 저지 농도를 측정한 결과 리팜피신에 대하여서만 MIC가 0.78 µg/ml로 높은 감수성을 나타냈고, 그 외의 항결핵제에 대하여서는 비교적 내성을 나타내었다. 따라서, 결핵 및 나병치료의 목적으로 리팜피신을 장기

경구 복용하는 환자에게 *B. bifidum* 제제를 병용 투여시 본래의 정상 효과를 기대할 수 없다. 고로, 본래의 정상 효과는 그대로 유지하면서 리팜피신에 내성인 균주의 개발에 필요했고, 그 목적으로 모균주를 MNNG로 처리하였다. 모균주를 대수기 중기까지 배양한 후 MNNG를 50 µg/ml과 100 µg/ml의 농도로 30분과 60분 처리하여 리팜피신에 내성인 30균주들을 선발하였다. 리팜피신에 내성인 이 30 균주들은 MIC 800 µg/ml과 그 이상으로 내성이 1,000배 이상 상승하였다. *B. bifidum*의 경우 MNNG의 처리에 의해 비교적 용이하게 돌연변이가 일어났고, 그 내성도도 MIC 800 µg/ml 또는 그 이상으로 높았다. 이러한 현상을 *Lactobacill sporogenes*¹⁵⁾와 *Streptococcus faecalis*¹⁶⁾ 경우에서도 관찰되었다.

생화학적 특성을 유산 생성능, *E. coli* 생육 억제능을 측정하여 모균주와 내성 균주를 비교, 검토하였다. 유산 생성능을 측정한 결과, 모균주는 유산을 10.36 mg/ml을 생산하였고, 돌연변이 균주 30종은 이 보다는 조금은 낮으나 유사한 양의 유산을 생산하였다. 돌연변이 조작에 의해 이 균의 특성중의 하나인 유산 생산에는 거의 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다. 이들 중 유산 생산량이 모균주와 가장 유사한 RFR11, RFR21 그리고 RFR61을 선발하여 *E. coli* 생육 억제능을 측정하였다. 장내 세균이 생산하는 유기산은 장내의 pH를 저하시켜 장내에 유해한 세균들의 성장을 억제시켜 장내 정상 세균총을 유지하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 최근에는 이런 유기산의 생성 능력을 증강시키기 위하여 β-galactosidase의 생성을 증가시키는 돌연변이 균주를 개발하는 연구도 진행되고 있다.¹⁷⁾ *B. bifidum*은 혐기성 균으로 통성 혐기성 균인 *E. coli*와 함께 배양할 수 있는 방법이 없었으므로, *B. bifidum*의 배양 상등액을 1/4과 1/2양이 되도록 시험용 배지를 조제한 후, 여기에 *E. coli*를 접종하여 시험하였다. 이때 *B. bifidum*배양 상등액을 1/4양 넣은 배지의 평균 pH가 5.72, 1/2양 넣은 배지의 평균 pH가 4.92였다. *E. coli*생육 억제능을 실험한 결과 모균주는 *B. bifidum*배양 상등액을 넣지 않은 배지에서 배양한 *E. coli*보다 *B. bifidum*배양 상등액을 넣지 않은 배지에서 배양한 *E. coli*보다 *B. bifidum*배양 상등액을 1/4양 넣어 배양한 경우 *E. coli*의 성장이 약 1,100배 정도 감소하였고, 1/2양 넣어

문헌

배양한 경우 거의 성장을 보이지 않았다. 돌연변이 균주들은 *B. bifidum* 배양 상등액을 1/4양 넣은 경우 600~1,100배 정도로 *E. coli*의 성장을 억제하였고, 1/2양 넣은 경우 거의 성장이 없었다. 따라서, 모균주와 돌연변이 균주들은 비슷함 *E. coli*생육 억제능을 가지고 있었다. 또, 단순히 유기산 생성에 의해서만 *E. coli*의 생육이 억제되는가를 알기 위하여 시험용 배지의 pH를 5.72와 4.92로 맞추어서 시험한 것과 비교시, *B. bifidum*배양액을 1/4양과 1/2양을 넣어 배양시킨 것이 pH를 5.72와 4.92로 맞춘 것보다 각각 400~600배와 800~1,200배로 *E. coli*의 성장이 억제되었다. 유기산 생성균에 의한 *E. coli*의 생육 억제 효과는 수소이온 농도, 유기산의 작용, 항생제의 생성 및 H₂O₂의 생성에 의한 것이라는 보고가 있는데,¹⁸⁻²⁰⁾ 본 실험에서도 *E. coli*의 생육 억제 효과는 단순히 pH의 저하때문이 아니라, 여러 복합적인 요소에 의한 것이라고 여겨진다.

선발된 리팜피신내성 돌연변이 균주들이 리팜피신 내성을 유지하고 있는지를 알기 위하여 8개월 동안 약 2주에 한번씩 계대하여 MIC를 측정한 결과 MIC가 800 µg/ml로 내성이 유지되어 용이하게 복귀 돌연변이가 일어나지 않는 것으로 사료되었다.

리팜피신 내성 균주들이 리팜피신을 불활성화 시킨다면 이 균주들을 제제화하여 리팜피신과 병용 투여시 리팜피신 본래의 효과를 얻을 수 없으므로, *in vitro*상에서 리팜피신 불활성화 가능성 여부를 보았다. 그 결과, 리팜피신을 함유한 배지에서 내성 균주들을 배양한 후 배양액에 잔존하는 리팜피신이 활성을 그대로 유지하였다. 따라서 내성 균주들에 의해 리팜피신이 불활성화 되지 않는 것을 알 수 있었다. 리팜피신의 내성 기전은 리팜피신의 수용체인 DNA-dependent RNA polymerase²¹⁾의 β-subunit의 변화^{22,23)}와 세포막 투과력의 변화^{24,25)}에 의한 것이라고 알려져 있으며, *B. bifidum* 내성균주의 기전도 그 중의 하나라고도 추측된다.

감사의 말씀

본 연구는 서울대학교 신의약품 개발연구 센터(과학재단), 보건사회부 및 서울대학교 약학 연구 재단의 지원에 의해 수행된 것으로 지원에 감사드립니다.

- 1) Surdre, P., Dam, G., and Kochi, A.: Tuberculosis; a global overview of the situation today. WHO Bulletin OMS. **70**, 149-159 (1992).
- 2) 대한 결핵협회: 한국의 결핵실태 P5 (1986).
- 3) WHO: Leprosy situation in the world and multi drug therapy coverage. Weekly epidemiological record. **21**, 153-160 (1992).
- 4) Committee on treatment of international union against tuberculosis and lung disease: Antituberculosis regimens of chemotherapy. *Bull. Int. Union. Tuberc. Lung. Dis.* **63**, 60 (1988).
- 5) Shapiro, S.: *Clinical medicine* **7**, 295 (1960).
- 6) Nechetes, H. and Beok, C.: *Applied Therapeutics*, 465 (1965).
- 7) 臨床과 微生物 **13**, 87 (1986).
- 8) 小兒科臨床, **27**, 1266 (1974).
- 9) John, B.J.: *Genetics*. Houghton Mifflin Co. p. 352 (1975).
- 10) Adelberg, E.A., Mandell, M. and Chen, G.C.C.: Optimal conditions for mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in *Escherichia coli* K12. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **18**, 788-795 (1965).
- 11) Schwartz, A.C. and Stadtman, T.C.: Small colonies of *Clostridium sticklandii* resulting from nitrosoguanidine treatment and exhibiting defect in catabolic enzymes. *J. Bacteriol.* **104**, 1242 (1970).
- 12) William, H.: *Official methods of analysis of the association of official analytical chemists*. Association of official analytical chemist. Benjamin Franklin Station. Washington, DC. p. 245 (1970).
- 13) Phillipp, G.: *Manual of methods for general bacteriology*. ASM. Washington, DC. p. 226 (1981).
- 14) Sneath, P.U.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G.: *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Williams & Wilkins Co., Baltimore, pp 1418-1434 (1986).
- 15) Kim, H.S., Choi, S.H., Choi, E.C., Lee, J.C. and Kim, T.H.: Development of *Lactobacillus sporogenes* resistant to rifampicin, an antituberculosis agent. *Kor. J. Microbiol.* **27**, 155-161 (1989).
- 16) Kim, S.H.: Development of *Streptococcus faecalis* resistant to rifampicin. *M.S. Tesis*. SNU, Korea

- (1992).
- 17) Kim, Y.M., Lee, J.C., Choi, Y.J., and Yang, H.C.: Studies on production of β -galactosidase by *Lactobacillus sporogenes*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **13**, 185-189 (1985).
 - 18) Metha, A.M., Patel, K.A. and Dave, P.J.: Isolation and purification of an inhibitory protein from *Lactobacillus acidophilus* AC. *Microbios.* **37**: 37-43 (1983).
 - 19) Suaan, F.B., and Klaehammer, T.R.: Detection and activity of lactacin b, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 1808 (1983).
 - 20) Roth, L.A., and Keenan.: Acid injury of *E. coli*. *Can. J. Microbiol.* **17**: 1005-1021 (1971).
 - 21) Burgess, R.R.: RNA polymerase. *Ann. Rev. Biochem.* **40**, 716-719 (1971).
 - 22) Rabussay, D., and Zilling, W.: Rifampicin resistant RNA polymerase from *E. coli* altered in the β subunit. *FEBS Lett.* **5**, 104 (1969).
 - 23) Linn, T., Losick, R. and Sonenshein, A.L.: Rifampicin resistance mutation of *B. subtilis* altering the electrophoretic mobility of the β subunit of RNA polymerase. *J. Bacteriol.* **122**, 1387 (1975).
 - 24) Hui, J., Gordon, N. and Kajioka, R.: Permeability barrier to rifampicin in *Mycobacteria*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **11**, 773 (1977).
 - 25) Kohno, K., Olizumi, K., and Oka, S.: Mode of action of rifampicin on *Mycobacteria*. *Ann. Rev. Resp. Dis.* **107**, 1006 (1973).