

항결핵제, 리팜피신에 내성인 유산균 *Lactobacillus sporogenes* 의 개발

김희선 · 최성숙 · 최응철 · 김병각 · 이정치* · 김태한*

서울대학교 약학대학, *일동제약(주) 중앙연구소

Development of *Lactobacillus sporogenes* Resistant to Rifampicin, an Antituberculosis AgentKim, Hee-Sun, Sung-Sook Choi, Eung-Chil Choi, Byong-Kak Kim,
Jung-Chi Lee* and Tae-Han Kim*

College of Pharmacy, Seoul National University and

*Research Laboratories, Il-Dong Pharm. Co., Ltd.

ABSTRACT: *Lactobacillus sporogenes* was treated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) to obtain resistant mutants to rifampicin. Fifty-eight strains of the NTG-induced mutants showed distinct resistance to rifampicin and nine mutants were selected for further studies. They also exhibited identical characteristics with the parent *Lactobacillus sporogenes* when they were tested for spore formation, acid formation and growth inhibition of *E. coli*. From *in vitro* test it was identified that rifampicin is not inactivated by certain factors of the rifampicin resistant mutants. It is suggested that they can be utilized as efficient normalizing agents for human intestinal flora when they are simultaneously taken with rifampicin

KEY WORDS □ *Lactobacillus sporogenes*, rifampicin resistant mutant, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG)

유산균은 장내 세균총을 구성하고 있는 주요한 균들 중의 하나로서, 인체에 아주 유용한 균으로 알려져 있다(Sharpe, 1981). 1908년 Metchnikoff가 유산균 발효유에 의한 불로장수설을 주장한 이래 독일, 일본 등에서 유산균 제제들이 많이 만들어져 사용되어 왔다.

유산균 제제는 그 효과면에서 영양효과(Breslaw and Kleyn, 1973; Goh *et al.*, 1988)와 보건효과(Mann and Sperry, 1974; Hepner *et al.*, 1979; Rowland and Grasso, 1975)로 대별할 수 있는데, 그 영양효과로는 우유에 함유된 양질의 단백질, 지방, 유당을 분해하여 소화흡수율을 높이고, 칼슘, 인, 철의 흡수를 촉진시키며, 유산균 세포벽 성분에 의한 섬유질 효과로서 장내 유용균의 번식

을 촉진시키고 변비를 개선하며, cholesterol 흡수를 억제하여 대장암, 심장병, 당뇨, 비만, 당뇨병, 충수염을 예방하는 효과를 들 수 있고, 보건 효과로는, 장내 세균총 개선과 장내 부패억제, 설사 및 변비의 치료, 혈중 cholesterol 저하작용 및 장수효과, 제암효과를 나타내는 것으로 보고되어 있다. 한편 항결핵제를 장기복용하거나 항생제를 복용하는 환자의 경우는 장내 세균총이 파괴되어, 흡수부전, 소화불량 등으로 인한 여러가지 부작용이 생길 수 있으므로, 항결핵제 또는 항생제와 유산균 제제를 병용하도록 권장되고 있다(Shapiro, 1960). 그런데, 이때 사용되는 항결핵제 및 항생제가 유산균까지 사멸시킨다면 유산균 제제의 복용의 의미가 없게 된다. 본 연구의 예비실험에서, 유

산균 제제에 사용되는 *Lactobacillus sporogenes*의 9종의 항결핵제에 대한 감수성, 내성을 검토한 결과 rifampicin에 대하여 특이적으로 높은 감수성을 나타냄이 밝혀졌다. 따라서 *Lactobacillus sporogenes*를 생산용 균주로 하는 유산균 제제를 rifampicin과 병용하여 사용시 유산균에 의한 효과를 기대할 수 없다. 이에 본 연구자들은 rifampicin이 결핵치료 및 나병치료제로서 (Riva, 1972; Burgess, 1971) 널리 사용되고 장기간 복용해야 하는 약제임을 감안하여, rifampicin에 감수성이 *Lactobacillus sporogenes* 균주로 rifampicin과 병용투여시 효과를 갖기 위해서는, 내성균주를 변이시키는 것이 필요하다고 생각하여, rifampicin에 내성이면서도 유산균 고유의 특성 및 기능을 가지는 균주를 개발하고자 하였다.

즉 N-methy-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) 처리법을 사용하여 rifampicin 내성 mutants를 얻고, 선발된 균주들에 대해 rifampicin에 대한 내성도를 확인한 후, parent와 그 생화학적 특성인 포자생성능, 유산생성능 (William, 1970), *E. coli* 생육억제능을 비교, 검토해 보았다. 또한 *in vitro* 실험을 통해 rifampicin이 그 내성균주들에 의해 불활성화되지 않음을 검토하였다.

재료 및 방법

균 주

일동제약에서 분양된 *Lactobacillus sporogenes* 균주 및 본 연구실에서 보관하고 있는 *E. coli* CSH 26과 *Serratia marcescens* YH. S3를 사용하였다.

배 지

Lactobacillus sporogenes 생육배지로는 *Lac. sporogenes* 배양배지를 사용하였고, *Bacillus subtilis*, *E. coli* 생육배지로는 nutrient broth (NB, Difco Co.) medium을 사용하였다. *E. coli* 생육억제능 실험에 사용한 *E. coli* 선택배지로는 EMB agar (Difco Co.)를 사용하였다.

최소저지농도 (MIC)

Slant에 보관하고 있는 균을 배양배지에 접종한 후 37°C에서 하룻밤 배양하고 배양액을 배양배지

로 200배 희석하여 MIC 측정용 균액으로 하였다 (생균 5×10⁶/tube). MIC 측정은 액체 10배 희석법을 사용하였다.

NTG 처리 및 내성 mutants의 분리

*Lac. sporogenes*에 대한 NTG 처리는 Adelberg (1965) 등의 방법을 변형하여 실시하였다. *Lac.* 균주를 37°C에서 log phase에 도달할 때까지 10시간 배양하여 NTG 처리 균액으로 하였다. NTG는 50 µg/ml 농도로 (pH 6.8) 37°C에서 30분간 균체에 처리했다. NTG 처리한 균체를 현탁시킨 액 200 µl를 rifampicin (10 µg/ml)를 포함한 용해한 한천배지에 가하여 평판을 만들고, 같은 방법으로 10개의 평판을 만들었다. 37°C에서 48시간 배양시킨 후 생성된 집락을 관찰하고, 그 중 59개의 집락을 취해 순수분리하였다.

내성유지시험

NTG 처리하여 얻은 mutants를 액내 배양한 후 10 µg/ml의 rifampicin을 함유한 고체배지에 10일 동안 5회에 걸쳐 subculture하여 복귀돌출 변이가 일어나는지를 관찰하였다.

내성 mutants의 rifampicin에 대한 MIC 측정

rifampicin을 각 농도별로 (4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.1 mg/ml) 조제한 후, 각각 2ml씩 취하여 용해한 한천배지 18ml와 혼합하여 petri dish에 부어 희석계 plate를 만들고, 여기에 돌연변이 균주액을 접종했다. 37°C에서 48시간 배양 후 성장여부를 관찰하여 균의 성장이 억제된 최소 항생물질 농도를 MIC로 정하였다. 이들 mutants 중 MIC에 따라 9가지 균을 선별하여 그 생화학적 특성 (포자형성능, 유산생성능, *E. coli* 생육억제능)을 parent와 비교, 검토하였다.

열저항성 및 포자형성능 시험

Parent 및 9가지 mutants의 배양균액을 75°C water bath에서 20분간 열처리한 후 열처리된 균액을 새 배지에 접종하고 37°C에서 하룻밤 배양한 후 균의 성장여부를 관찰하고, 열처리한 균액을 Schaffer-Fulton 방법에 따라 포자염색하여 포자생성 여부를 관찰하였다.

산도정량

37°C에서 overnight 시켜 전 배양한 parent 및 mutants 균액을 배양배지에 접종하고 (1:50) 37°C에서 균액의 pH가 최대로 떨어지는 15시간

정치배양하였다. 배양액을 원심분리하여 얻어진 액을 희석한 후 NaOH 용액으로 중화적정하였고, 이때 소비된 NaOH 용액의 volume 을 유산량으로 환산하였다.

대장균 생육억제 시험

배양배지 (pH 6.8)에 *Lac. sporogenes* parent 및 mutants 와 *E. coli* 를 각각 10 : 1, 10⁴ : 1 의 비율로 접종하고, control group 으로는 *E. coli* 만을 접종하였다. 37°C에서 정치배양시키면서 6, 15, 21 시간 간격으로 sample 을 취하여 시간에 따른 *E. coli* 생균수를 측정하였다. *E. coli* 의 고정증식 배지로는 E.M.B. 한천배지를 사용하였다.

In vitro 에서 내성 mutants 에 의한 rifampicin 의 불활성화 가능성 시험

전 배양한 균액 5ml 를 10 µg/ml 의 rifampicin 을 포함한 200 ml 의 배양배지에 접종하여 (1 : 40) 37°C에서 하룻밤 동안 정치배양하였다. 배양액을 3,000 rpm 에서 30 분간 원심분리한 후, 상등액 중에 남아있는 rifampicin 을 chloroform 으로 추출하였다. 이 추출액을 농축하여 disc 당 rifampicin 농도가 10 µg 이 되게 disc 를 만들었다. disc 를 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 agar plate 에 고정시키고 37°C에서 하룻밤 동안 배양한 후 생긴 저지원의 직경을 측정하여 남아있는 rifampicin 양을 계산하였다. 이때 control 균주로서 rifampicin 에 insensitive 한 *Serratia marcescens* 를 사용하였다.

결과 및 고찰

최소저지농도(MIC)의 측정

Lactobacillus sporogenes parent 에 대한 9종의 항결핵제들의 MIC 측정 결과를 Table 1에 나타내었다. *Lac. sporogenes* 는 대부분의 항결핵제에 대해 내성을 보였으나 rifampicin 에 대해서는 특이적으로 높은 감수성을 보였다. 따라서 *Lac. sporogenes* (parent)를 이용한 유산균 제제와 rifampicin 을 병용했을 때 *Lac. sporogenes* 가 갖는 효과를 기대할 수 없다.

내성 mutants 의 분리

Lactobacillus sporogenes 를 NTG 처리한 후 10 µg/ml 농도의 rifampicin 을 함유한 plates 에

Table 1. MIC of antituberculosis agents against *Lactobacillus sporogenes* (parent).

Antituberculosis agent	MIC (µg/ml)
Streptomycin	1.
Kanamycin	1.
Rifampicin	0.01
Capreomycin	12.5
Ethambutol	100
INAH	100
Cycloserine	10
Pyrazinamide	100
Prothionamide	100

Table 2. MIC of rifampicin against NTG induced mutants of *Lactobacillus sporogenes*.

MIC(ug/ml)	Total strains
25	2
50	4
100	7
200	29
400	16
0.01	Parent

서 37°C, 48 시간 배양시켰을 때 한 petridish 당 평균 20-25 개의 colony 가 형성되었다. 각 petridish 당 평균 3-4 개의 colony 를 취한 후, 액내 배양하고 순수분리하여 총 59 개의 rifampicin 내성 mutant 균주를 얻었다(Table 2).

고체배지 희석법에 의해 mutant 들에 대한 rifampicin 의 MIC 를 측정한 결과, Table 2에 나타난 바와 같이 총 58 개의 mutants 중 MIC 가 25 µg/ml 인 것 4 개, 100 µg/ml 인 것 7 개, 200 µg/ml 인 것 29 개, 400 µg/ml 인 것 16 개 등 5 가지 group 으로 구분하였으며, 이들의 MIC 를 parent 와 비교시 MIC 가 2,500-40,000 배 정도 상승되었음이 밝혀졌다. 따라서 이들 내성균주를 제제로하여 rifampicin 과 병용투여할 경우 정상효과를 기대할 수 있다고 생각된다.

Rifampicin 에 대한 내성유지 실험

NTG 처리에 의해 얻어진 rifampicin 내성 mutants 가 rifampicin 에 대해 지속적으로 내성을

유지하는지, 그렇지 않으면 복귀돌연변이에 의해 그 내성을 상실하는지를 조사하기 위하여 총 59 개의 mutant 를 10 µg/ml 농도의 rifampicin 을 함유한 plate 에서 10 일 동안 5 회에 걸쳐 subculture 한 결과, 1 개의 mutant 만이 복귀돌연변이 되었다. 7 개월 후에도 내성을 그대로 유지하고 있음이 밝혀졌다.

열저항성 및 포자형성능 실험

배양한 균액을 열처리한 후 새 배지에 배양했을 때, parent 와 9 가지 mutants 모두 다 성장하였으며, 열처리한 균액을 포자염색법에 의해 염색시 포자가 녹색으로 관찰되었다. 따라서 이들을 제제화 할 경우 포자상태로 장기보존이 가능할 것이므로 그 제제의 안정성면에서 검토해 볼때 바람직하다고 생각된다.

내성 mutant 균주들의 산 생성력

Parent 및 9 가지 mutants 에 의해 생성되는 유산농도를 비교해 본 결과, parent 에 의해 생성되는 유산농도는 약 7.4 mg/ml 이고, mutants 는 parent 에 비해 약 80-90% 정도의 유산을 생성함을 알 수 있었다 (Table 3). 따라서 NTG 처리에 의해 얻어진 mutants 의 유산생성능이 parent 와 비교시 약간 떨어졌지만 우수한 편이라 사료된다. 대부분의 유산균에 의해 생성되는 유산이 정상효과 및 기타 영양, 보건효과에 매우 중요한 영향을 미친다고 보고되어 있다. 또한 유산은 장내의 pH 를 저하시켜 장내에 유해한 세균들에 대해 bactericidal effect 로 나타나므로 장내 세균총의

균형 개선에 아주 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 최근에는 이런 유산 생산력 향상을 목적으로 균주를 개발하기 위해 균주를 mutation 시킨 후 β-galactosidase 의 생성증가로 말미암아 유산 생성이 우수해진 균주를 선별하는 연구도 많이 진행되고 있다 (Yu et al., 1986 ; Kim et al., 1985).

대장균 생육억제 시험

Lactobacillus sporogenes 가 장내 유해균의 성장을 어느 정도 억제하는가를 알아보기 위해 *E. coli* 를 그 대상균으로 하여 *Lac. sporogenes* parent 및 mutants 에 의한 생육억제능을 비교, 검토하였으며, 그 결과를 Fig.1 에 나타내었다. *E. coli* : *L. sporogenes* 를 1 : 10 의 비율로 혼합배양시, 15-21 시간대에서 parent 의 경우는 *E. coli* 수가 control 과 비교시 거의 감소되지 않는데 비해 mutant 들과 혼합배양한 경우는 평균 1/15 정도로 그 성장이 억제되었다. *E. coli* : *L. sporogenes* 를 1 : 10⁴ 비율로 혼합배양시 parent 의 경우는 *E.*

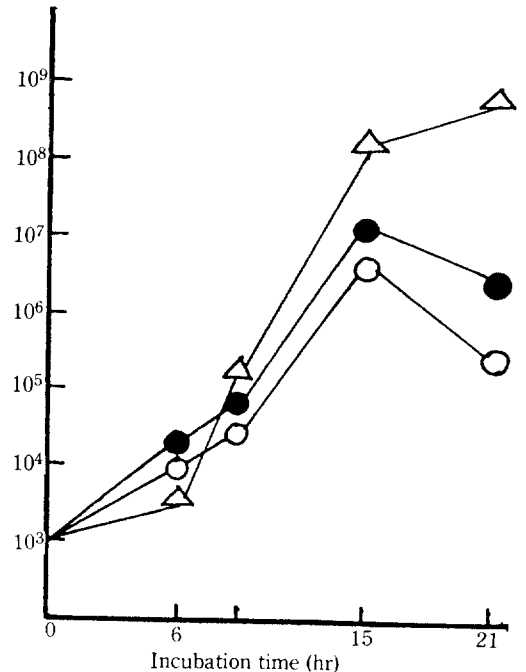


Fig. 1. Changes in the numbers of *E. coli* which was grown with *Lactobacillus sporogenes* (*E. coli*:*L. sporogenes* = 1 : 10).
 ○ : No. 3 + *E. coli*
 ● : Parent + *E. coli*
 △ : Control (*E. coli* only)

Table 3. Lactic acid concentration in the cultures of *Lactobacillus sporogenes*.

Strain No.	Lactic acid concentration (mg/ml)
Parent	7.4 (100%)
3	5.6 (76%)
14	6.5 (88%)
17	6.1 (82%)
20	6.3 (85%)
29	6.3 (85%)
32	6.3 (85%)
35	5.6 (76%)
47	6.5 (88%)
50	5.9 (80%)

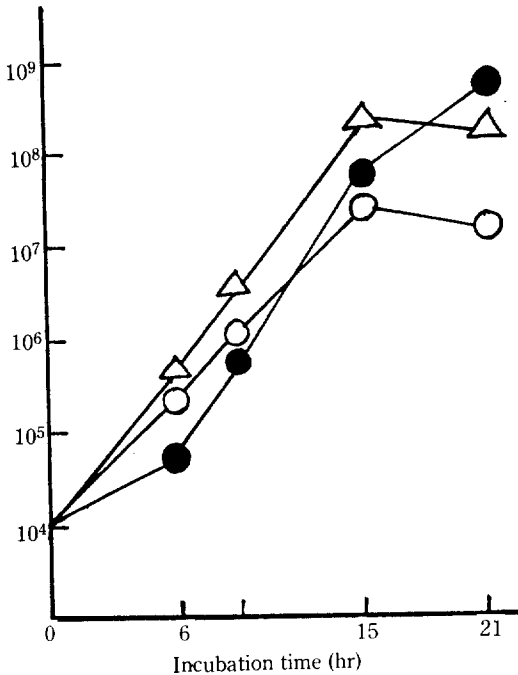


Fig. 2. Changes in the numbers of *E. coli* which was grown with *Lactobacillus sporogenes* (*E. coli*:*L. sporogenes* = 1:10⁴).
○: No. 3 + *E. coli*
●: Parent + *E. coli*
△: Control (*E. coli* only)

coli 수가 약 1/200 정도의 감소율을 보였고, mutants 중 억제능이 우수한 No. 3 mutant의 경우는 약 1/2000 정도의 감소율을 나타내었다. 이상의 실험을 통해 parent와 mutants들의 *E. coli* 생육억제능을 비교시, parent에 비해 mutants에 의한 억제능이 약간 증가하거나, 비슷한 결과를 나타내었다. 유산균에 의한 *E. coli* 억제효과는 수소이온농도(pH), 유기산 분자의 작용, 항생제 생성, H₂O₂ 생성 및 peptide 구조로된 bacteriocin에 의해 나타난다고 보고된 바 있는데(Metha et al., 1983; Susan et al., 1983; Deklerk, 1961; Roth, 1971), 본 실험에서 *E. coli*와 *Lac. sporogenes*를 혼합배양도중 시간별로 pH를 측정해 본 결과 *E. coli* 단독배양시의 pH에 비해 6시간 이후부터 혼합배양시의 pH가 약간 떨어지긴 하였지만 그다지 큰 차이가 없었다. 따라서 단지 pH 영향에 의해 *Lactobacillus sporogenes*가 *E. coli*에 대한 억제효과를 나타낸다고 단정하기는 어렵

Table 4. The possibility of *in vitro* inactivation of rifampicin by culture of the rifampicin resistant mutants of *Lactobacillus sporogenes*.

Strain No.	Inhibition zone (mm)*	Inactivation
3	21	No
14	22	No
17	21	No
20	20	No
29	21	No
32	22	No
35	22	No
47	22	No
50	21	No
Control**	23	No

* The size of the inhibition zone against *B. subtilis* ATCC 6633 by rifampicin extracted from the filtrated culture of rifampicin resistant mutants of *Lactobacillus sporogenes*.

** Strain: *Serratia marcescens*.

다. 또한 J. Tramer(1966)의 보고에 의하면 *Lac. acidophilus*의 경우 pH 4.2 이상에서는 *E. coli* 억제능이 거의 없다고 하였는데, 본 실험의 경우 pH가 4.2 이상이였음에도 불구하고 억제효과를 나타내는 것으로 보아, 이 균주의 *E. coli*에 대한 억제효과가 pH 변화외에 다른 inhibitory substance의 존재에 기인될 수 있다고 사료된다.

*In vitro*에서 내성 mutants에 의한 rifampicin 불활성화 가능성 시험

본 rifampicin 내성균주가 rifampicin을 불활성화 시킨다면, 이 균을 제제화하여 사용할 때, rifampicin 본래의 치료 목적을 달성할 수 없으므로 *in vitro* 실험으로 불활성화 될 가능성 여부를 시험해 보았다. 내성 mutant에 10 µg/ml 농도의 rifampicin을 넣고 배양한 후 배양액을 원심분리, 상침액 중에 잔존하는 rifampicin 양을 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 plate 상에 생성된 저지원의 크기로 계산하여 control 균에 의한 저지원의 크기와 비교시 거의 차이가 없었다(Table 4). 즉 이러한 내성균주에 의해 rifampicin이 불활성화되지 않음을 보였으며, 따라서 이 내성균주를 이용한 유산균 제제를 rifampicin과 경구로 병용투여할 경우, rifampicin에는 아무런 영향을 미치지 않고 소기의 치료효과를 얻을 수 있다고 생각된다. 항

생제에 대한 균의 생화학적 내성기전은 크게 target site의 변화, 세포막 투과성의 변화, 항생제에 대한 inactivating enzyme의 생성으로 나눌 수 있으며(Gale *et al.*, 1972) 지금까지 보고된 rifampicin에 대한 내성기전은 본 항생제의 target site인 RNA polymerase의 β -subunit의 변화와 cell permeability의 변화에 의한 것이었다(Hui *et al.*, 1977; Morishita and Yura, 1976). 따라서 앞으로 본 실험에서 얻은 rifampicin에 내성인 균주들의 내성기전을 알아보는 것도 바람직

한 연구과제라 할 수 있다.

위와 같은 실험결과를 볼 때, 본 실험에서 얻어진 rifampicin 내성 *Lac. sporogenes* 균주들은 parent *Lac. sporogenes*가 갖는 특성을 그대로 유지함과 동시에 rifampicin에 내성을 갖고 있다고 할 수 있으므로, 본 내성균을 유산균 제제원으로 이용할 수 있으며, 그 유산균 제제는 rifampicin을 주치료제로 하는 결핵치료에 이용될 수 있다고 사료된다.

적 요

*Lactobacillus sporogenes*를 NTG로 처리하여 rifampicin에 내성인 돌연변이 균주를 얻었으며, 이 중 58종이 rifampicin에 현저한 내성을 보였다. 9종의 mutants를 선발하여 그 생화학적 특성을 검토한 결과, 포자형성능, 산생성능, *E. coli* 생육 억제능 면에서 parent와 유사한 특성을 나타내었다.

In vitro 시험을 통해, 내성균주들에 의해 rifampicin이 불활성화 되지 않음이 밝혀졌다. 따라서 이들 mutants를 유산균 제제원으로 사용할 수 있으며, 그 제제는 rifampicin과 병용투여시, 효과적인 정장제로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

REFERENCES

1. Adelberg, E.A., M. Mandell and G.C.C. Chen, 1965. Optimal conditions for mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in *Escherichia coli* K12. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **18**, 788-795.
2. Breslaw, E.S. and D.H. Kleyn, 1973. *In vitro* digestibility of protein in yogurt at various stages of processing. *J. Food Sci.* **38**, 1016-1021.
3. Burgess, R.R., 1971. RNA polymerase. *Annu. Rev. Biochem.* **40**, 716-719.
4. Deklerk, H.C. and J.N. Coetzee, 1961. Antibiosis among lactobacilli. *Nature*. **192**, 340-341.
5. Gale, E.F., E. Cundliffe, P.E. Reynolds, M.H. Richmond and M.J. Waring, 1972. The molecular basis of antibiotic action, 2nd ed., John Wiley & Sons Ltd., Bristol, 550-561.
6. Goh, J.S., I.K. Kwon, J.K. Ahn and Y.H. Yoon, 1988. Fermentation of milk by *Bifidobacterium bifidum* ATCC 11863. *Korean J. Anim. Sci.* **30**, 618-630.
7. Hepner, G., R. Fried, S.S. Jeor, L. Fusett and R. Morin, 1979. Hypocholesterolemic effect of yogurt and milk. *Amer. J. Clin. Nutr.* **32**, 19-24.
8. Hui, J., N. Gordon and R. Najioka, 1977. Permeability barrier to rifampicin in Mycobacteria. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **11**, 773-779.
9. Kim, Y.M., J.C. Lee, Y.J. Choi and H.C. Yang, 1985. Studies on Production of β -galactosidase by *Lactobacillus sporogenes*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **13**, 185-189.
10. Mann, G.V. and A. Spoerry, 1974. Studies of a surfactant and cholesteremia in the Maasai. *Amer. J. Clin. Nutr.* **27**, 464-469.
11. Metha, A.M., K.A. Patel and P.J. Dave, 1983. Isolation and purification of an inhibitory protein from *Lactobacillus acidophilus* AC, *Microbios.* **37**, 37-43.
12. Morishita, T. and T. Yura, 1976. Altered nutritional requirements associated with mutations affecting the structure of ribonucleic acid polymerase in *Lactobacillus casei*. *J. Bacteriol.* **125**, 416-422.
13. Riva, S., L.G. Silvestri, 1972. Rifamycins: a general view. *Annu. Rev. Microbiol.* **26**, 199-224.
14. Roth, L.A. and Keenan, 1971. Acid injury of

- Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* **17**, 1005-1021.
15. Rowland, I.R. and P. Grasso, 1975. Degradation of N-nitrosoamines by intestinal bacteria. *Appl. Microbiol.* **29**, 7-12.
 16. Shapiro, S., 1960. *Clinical medicine* **7**, 295.
 17. Sharpe, M.E., 1981. The genus *Lactobacillus*. *The prokaryotes*, **2**, 1653-1675.
 18. Susan, F.B. and T.R. Klaehammer, 1983. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 1808-1815.
 19. Tramer, J., 1966. Inhibitory effect of *Lactobacillus acidophilus*. *Nature*. **211**, 204-205.
 20. William, H., 1970. *Official methods of analysis of the association of official analytical chemists*. Association of official analytical chemist. Benjamin Franklin Station. Washington D.C., 245.
 21. Yu, W.C., J.C. Lee, Y.G. Choi and H.C. Yang, 1986. Studies on production of β -galactosidase by mutant of *Lactobacillus sporogenes*. *Kor. J. Appl. Microbiol Bioeng.* **14**, 75-84.

(Received Mar. 20, 1989)