

## Rifampicin과 Ofloxacin에 내성인 *Bifidobacterium bifidum* 균주의 개발

정영자 · 전명인 · 강창율 · 김병각 · 최응철\*  
서울대학교 약학대학

(Received November 29, 1994)

### Development of *Bifidobacterium bifidum* Strains Resistant to Rifampicin and Ofloxacin

Young-Ja Chung, Myoung-In Jeon, Chang-Youl Kang,  
Byoung-Kak Kim and Eung-Chil Choi\*  
College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-743, Korea

**Abstract**—*Bifidobacterium bifidum*, one strain of medical preparation being on the market for human intestinal disorders, was sensitive to rifampicin and fluoroquinolones. If this preparation is taken with rifampicin and fluoroquinolones, its therapeutic effect can't be expected. Serial passage of *B. bifidum* RFR61, which was obtained by MNNG mutation method,<sup>1)</sup> on agar with 2-fold minimal inhibitory concentration of ofloxacin produced *B. bifidum* OFR9 with minimal inhibitory concentrations of fluoroquinolones up to 4~256-fold higher than that for the original strain. *B. bifidum* OFR9 produced almost the same amount of organic acid as parental strain. This strain showed growth inhibitory activity against *E. coli* NM522, *Shigella dysenteriae* ATCC9752 and *E. coli* 078. No inactivations of rifampicin and ofloxacin by this resistant mutant strain were found.

**Keywords** □ *Bifidobacterium bifidum*, Rifampicin, Fluoroquinolones, Ofloxacin, Multi-step mutations, Resistant mutant

최근 세계보건기구 (World Health Organization, WHO)의 보고에 의하면, 서구유럽과 북미선진국에서 tuberculosis의 재확산을 경고하고 있으며, 특히 다약제 내성 결핵균(multidrug-resistant tuberculosis, MDR-TB)의 높은 출현이 HIV의 전염과 연관되고 있음을 강조하고 있다.<sup>2-3)</sup> 우리나라에서도 1992년 현재 73만명의 결핵환자가 보고 되어 있다.<sup>4)</sup> 나병은 *Mycobacterium leprae*의 감염에 의해 일어나는 질환으로 아직까지 아프리카, 아시아, 라틴아메리카의 많은 나라들에서 주요한 공중 보건문제로 남아있다.<sup>5)</sup> 특히 중복감염 나환자의 경우 dapsone, rifampicin 등 극히 일부의 약으로 치료가 제한되고 있으나 최근의 보고에서는 fluoroquinolone계 중에서 pefloxacin과 ofloxacin이 *M. leprae*의 임상적 치료제로써 연구되고 있다.<sup>6-8)</sup> 결핵환자 및 나병환자가 항결핵제 또는 항

나병제를 장기복용하는 경우에는 장내 정상 세균총이 파괴되어 흡수부전, 소화불량 등 장질환<sup>9)</sup>을 일으킬 수 있으므로 위의 약물과 정장용 생균제제를 병용하는 것이 바람직하다고 Gordon<sup>10)</sup> 등이 보고한 바 있다. 그런데, 이때 사용되는 약물들이 정장용 균주를 사멸시키거나, 반대로 정장균주가 약물을 불활성시키게 되면 정장제로써 유용하지 않게 된다. 따라서 본 연구에서는 현재 국내에서 시판되고 있는 정장용 생균제제에 포함되어 있는 정장균주의 하나인 *B. bifidum*을 항결핵제와 항나병제에 내성을 갖는 균주로 돌연변이시켜 결핵 및 나병 환자의 장내질환을 치료 또는 개선시킬수 있는 정장균주를 개발하고자 하였다. 본 실험에 사용한 *B. bifidum*은 소장 하부에서 대장에 주로 작용하는 정장균주로 유산 및 초산을 생산하여 장내 pH를 저하시키며, 각종 유해균의 증식억제작용이 있으며, 장관 연동을 촉진시키거나 변을 연화시

\*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

키는 작용을 갖고 있다.<sup>11)</sup> 또한 Macrophage 활성을 높여 대장균등의 Gram (-)균의 발육을 억제한다.<sup>12)</sup> 본 실험에서는 MNNG 처리로 얻은 rifampicin에 내성인 *B. bifidum* RFR61을 다단계 자연돌연변이 방법으로 fluoroquinolone계에도 높은 내성을 나타내는, 다제 내성균주인 *B. bifidum* OFR9을 개발하였다. 이 균주에 대해 정장용 생균제제로서의 개발 가능성을 검토해 보기 위하여 산생성능, *E. coli* 생육억제등의 생화학적 특성<sup>13)</sup>을 *B. bifidum* parent, *B. bifidum* RFR61과 비교 검토하였다. 또한, *Shigella dysenteriae* ATCC9752와 *E. coli* 078에 대한 장내 병원균 성장 억제 작용을 알아보았으며, rifampicin과 ofloxacin이 불활성화 된다면 치료목적을 달성할 수 없으므로 *in vitro* 실험을 통해 그 가능성을 알아보았다.

### 실험재료 및 방법

**시험균주**—본 실험에서는 일동제약에서 분양받은 *Bifidobacterium bifidum* 균주를 사용하였다. 그 외의 사용균주로는 본 연구실에서 보관하고 있는 *E. coli* NM522, *B. subtilis* ATCC6633, *Serratia marcescens* ATCC27117, *Shigella dysenteriae* ATCC9752, *E. coli* 078을 사용하였다.

**배지**—*B. bifidum* 생육배지로는 Blood-liver broth (BL broth)를 사용하였고, 보관용 배지로는 Skim milk broth를 사용하였다. 그 외 균주의 배지로는 Mueller-Hinton medium(MH medium, Difco Co.)을 사용하였다. 혐기성 배양은 Gas Pak Plus (BBL, Cat. No. 71040)와 anaerobic indicator (BBL)을 사용하였다.

**최소저지농도 (MIC)의 측정**—본 실험에서는 rifampicin (RFP), kanamycin (KM), isoniazid (INH), ethambutol (EB), pyrazinamide (PZA), D-cycloserine (D-CS), ofloxacin (OFLX), norfloxacin (NFLX), ciprofloxacin (CPFX), sparfloxacin (SPFX)등의 항결핵제 및 항나병제를 사용하였다. BL-broth에 전 배양한 균액을  $10^4$  CFU/loopful로 희석하여 2-fold 고체희석법으로 MIC를 측정하였다. 39°C에서 18시간 배양한 후 균의 성장을 관찰할 수 없는 최소 농도를 MIC로 하였다.

**이중 내성균주의 선별**<sup>14)</sup>—Skim milk 에 보관하고 있는 rifampicin에 내성인 균주 *B. bifidum* RFR61을

39°C에서 전 배양한 후 다시 BL-broth에 mid-logarithmic phase까지 배양하고 6,000 xg에서 5분간 원심분리한다. 상등액을 버리고  $10^{10}$  CFU/ml로 모아 10 µg/ml의 rifampicin과 2-fold MIC농도의 ofloxacin을 함유한 고체배지에 100 µl씩 가하여 39°C에서 36~48시간 혐기성 배양하고 돌연변이 집락을 선발하였다. 이상의 방법으로 4일간 연속적으로 실험하였다.

***B. bifidum*의 동정**<sup>15)</sup>—*B. bifidum*의 동정은 fructose-6-phosphate phosphoketolase 실험을 실시하였다.

**산도정량**—39°C에서 하룻밤 전 배양한 모균주와 돌연변이 균주를 새로운 BL-broth에 2.5% 접종하고 39°C, 24시간 배양하였다. 배양액을 6,000 xg에서 5분간 원심분리한 후 얻은 상등액을 멸균 증류수로 5배 희석하여 1% phenolphthalein 용액 2방울을 넣고, 0.1 N NaOH용액으로 중화 적정하였다.

***E. coli* 생육억제 시험**—*B. bifidum* 모균주와 돌연변이 균주들을 39°C에서 전 배양하고, 원심분리하여 상등액을 얻었다. 이 상등액을 새로운 배지에 가하여 pH 5.72와 pH 4.92로 맞춘 후 *E. coli* 생육억제 시험용 배지를 만들었다. 여기에 *E. coli* NM522 균주를 2.5% 접종하고 1시간 간격으로 8시간동안 일정량을 취하여 600 nm에서 흡광도를 측정하여 *E. coli* NM522의 생육억제를 관찰하였다. 이때 대조군으로는 *B. bifidum* 배양 상등액을 넣지 않은 pH 7.0의 BL-broth에서 키운 *E. coli* NM522 배양액을 사용하였다. 이때 *E. coli*의 생육억제가 pH의 저하에 의해서만 일어나는지를 알아보기 위하여 BL-broth 제조시 pH를 5.72와 4.92로 맞추어 준 배지에서 자란 *E. coli* NM522의 성장도도 측정하였다. 또한 각 배지에서의 생균수를 측정하여 생육억제 정도를 비교하였다.

**장내 병원균 성장억제 시험**—*Shigella dysenteriae* ATCC9752, *E. coli* 078 병원균에 대하여 위의 *E. coli* 생육억제 시험과 동일한 실험을 실시하였다. 2시간 간격으로 12시간동안 일정량을 취하여 흡광도를 측정하여 장내 병원균의 생육억제를 관찰하였다. 각 배지에서의 생균수를 측정하여 생육억제 정도를 비교하였다.

**내성 균주에 의한 rifampicin의 불활성화 가능성에 대한 시험**—전 배양한 내성 균주를 rifampicin 100 µg/ml 함유한 BL-broth에서 배양하였다. 배양액을

**Table I**—Antimicrobial activity of antituberculosis agents and fluoroquinolones against *B. bifidum* strains

Drug	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )		
	parent	RFR61	OFR9
Rifampicin	1	>256	>256
Kanamycin	128	256	256
Isoniazid	>256	>256	>256
Ethambutol	>256	>256	>256
Pyrazinamide	>256	>256	>256
D-cycloserine	64	64	64
Ofloxacin	16	16	64
Norfloxacin	1	1	64
Ciprofloxacin	1	1	32
Sparfloxacin	0.12	1	32

원심분리하여 상등액에 존재하는 rifampicin을 chloroform으로 추출하였다. 추출액을 10  $\mu\text{g/disc}$  농도의 rifampicin 디스크로 만들어 rifampicin의 역가 검정에 쓰이는 *B. subtilis* ATCC6633 균주를 함유하는 평판 위에 놓아 고정시키고 16시간 배양하였다. 이때 생긴 저지원의 크기를 표준 검량 곡선에 나타난 rifampicin 10  $\mu\text{g/disc}$ 의 저지원의 크기와 비교하여 불활성화 여부를 확인하였다. 이때 대조군으로는 rifampicin에 비감수성인 *Serratia marcescens* ATCC27117 균주를 사용하였다.

**내성 균주에 의한 ofloxacin의 불활성화 가능성에 대한 시험**—*B. bifidum* OFR9을 전 배양한 후 ofloxacin이 25  $\mu\text{g/ml}$  함유된 BL-broth에서 18시간 배양하고 원심분리하여 상등액으로 5  $\mu\text{g/disc}$  농도의 ofloxacin 디스크를 만들어 *B. subtilis* ATCC6633 균주를 함유하는 평판위에 놓아 고정시키고 16시간 배양한 후 생긴 저지원의 크기를 표준 검량 곡선에 나타난 저지원의 크기와 비교하여 불활성화 여부를 확인하였다. 이때 대조군으로는 ofloxacin에 비감수성인 *E. coli* 1130 균주를 사용하였다.

### 실험결과

***B. bifidum*에 대한 MICs**—*B. bifidum* 모균주, RFR61, OFR9에 대한 10종의 항결핵제 및 항나병제의 최소 저지 농도를 Table I에 나타내었다. *B. bifidum* 모균주는 rifampicin과 fluoroquinolone계에 감수성을 나타내었고 그 중 ofloxacin에 대해서는 약

**Table II**—The amounts of lactic acid produced by *Bifidobacterium bifidum* strains

Strain	Concentration (mg/ml)
Parent	10.36 (100%)
RFR 61	9.00 (86.96%)
OFR 9	9.27 (89.57%)

한 감수성을 나타내었다.

**내성 균주의 분리**—*B. bifidum* RFR61 균주에 대하여 spontaneous multi-step mutation방법을 사용하여 rifampicin과 ofloxacin에 이중 내성인 돌연변이 균주 20종을 선발하였다. 이중 ofloxacin에 대한 MIC가 64  $\mu\text{g/ml}$  이상인 3종의 균주를 선발하고 *B. bifidum* OFR9, OFR11, OFR21이라 명명하였으며 이중 OFR9에 대하여 실험을 진행하였다. *B. bifidum* OFR9 균주에 대한 fluoroquinolone계의 MIC를 측정된 결과 OFLX는 4배, NFLX는 64배, CPMX는 32배, SPFX는 256배 상승하였다.

***B. bifidum*의 동정**—선발된 돌연변이 균주가 *B. bifidum* 인지를 확인하기 위하여 *Bifidobacterium*의 대사과정중 특이하게 생성되는 fructose-6-phosphate phosphoketolase에 대한 시험을 실시한 결과, 돌연변이 균주와 모균주 모두 양성 결과인 적자색을 나타내었다.

**산도 정량**—모균주 및 돌연변이 균주에 의하여 생성되는 유기산량을 측정, 비교한 결과 돌연변이 균주의 유산 생성량이 모균주와 비교하여 약간 낮기는 하였으나 나 비슷한 생성량을 보였다 (Table II).

***E. coli* 생육 억제**—*B. bifidum*과 *E. coli*를 동시에 배양할 수 없었으므로 *B. bifidum*을 배양한 상등액을 pH 5.72와 4.92가 되도록 새로운 배지에 혼합한 다음 *E. coli* NM522를 접종하여 생육 억제 시험을 실시하였다. Fig. 1와 Fig. 2에서 보는 바와 같이 *B. bifidum* 모균주와 돌연변이 균주 배양액을 함유한 pH 5.72 배지에서 배양시킨 *E. coli*는 pH 7.0의 대조군보다 700~1200배로 성장이 감소하였다. 배양액으로 pH 4.92로 맞추어 준 배지에서 배양시킨 *E. coli*는 거의 성장을 보이지 않았다. *E. coli* 성장 억제를 시간별로 보면 균의 성장 초기부터 현저히 억제됨을 알 수 있었다. 배양 상등액을 혼합하지 않고 단지 pH만 5.72와 4.92로 맞추어 준 배지에서의 *E. coli* 성장은 대조군의 *E. coli* 성장에 비해 각각 400~600배, 900~1100배 억제되었다. 배양 상등액을 함유한 배지에서

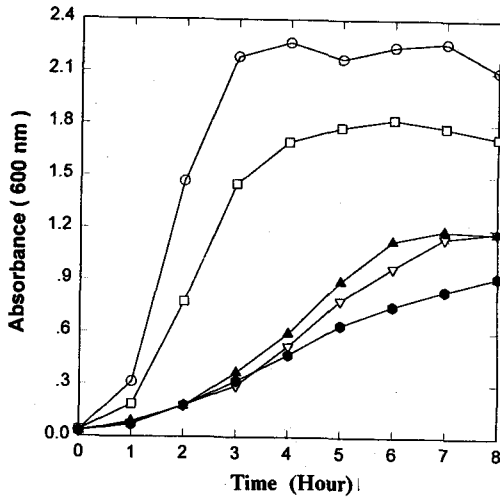


Fig. 1—Changes in the growth of *E. coli* NM522 in the cultivated medium of *Bifidobacterium bifidum* strains

- *E. coli* NM 522 pH 7.0
- *E. coli* NM 522 pH 7.0
- ▽ Culture broth of *B. bifidum* parent pH 5.72
- ▲ Culture broth of *B. bifidum* RFR 61 pH 5.72
- Culture broth of *B. bifidum* OFR 9 pH 5.72

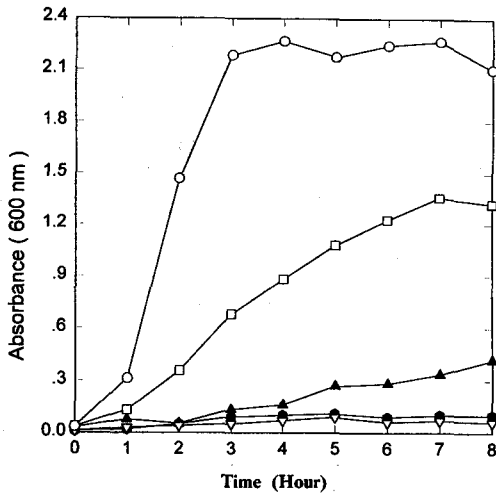


Fig. 2—Changes in the growth of *E. coli* NM522 in the cultivated medium of *Bifidobacterium bifidum* strains

- *E. coli* NM 522 pH 7.0
- *E. coli* NM 522 pH 4.92
- ▽ Culture broth of *B. bifidum* parent pH 4.92
- ▲ Culture broth of *B. bifidum* RFR 61 pH 4.92
- Culture broth of *B. bifidum* OFR 9 pH 4.92

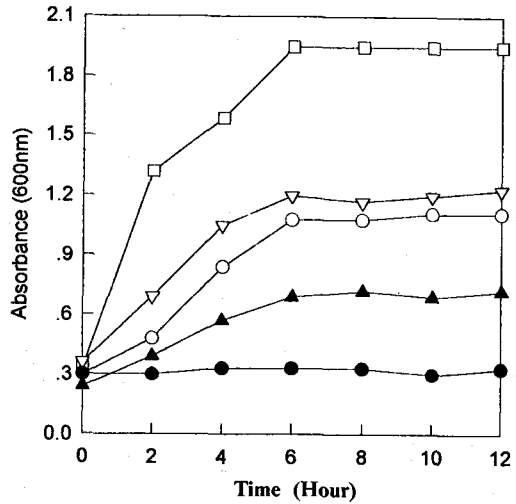


Fig. 3—Changes in the growth of *Shigella dysenteriae* ATCC9752 in the cultivated medium of *B. bifidum* OFR9

- *Shigella dysenteriae* ATCC9752 pH 7.0
  - ▽ *Shigella dysenteriae* ATCC9752 pH 5.72
  - ▲ *Shigella dysenteriae* ATCC9752 pH 4.92
  - *Shigella dysenteriae* ATCC9752 pH 5.72
  - *Shigella dysenteriae* ATCC9752 pH 4.92
- } BL-broth  
} BL-broth & culture broth

의 *E. coli* 성장이 더욱 억제됨을 알 수 있었다.

**장내 병원균 성장 억제**—Fig. 3과 Fig. 4에서 보는 바와 같이 배양 상등액을 함유한 pH 4.92 배지에서는 *Shigella dysenteriae* ATCC9752와 *E. coli* 078 모두 성장을 보이지 않았다. pH 7.0의 대조군과 비교시, 배양 상등액 함유 pH 5.72 배지에서는 *S. dysenteriae*의 성장이 400~600배 억제되었고, 배양 상등액 함유 pH 4.92에서는 성장이 관찰되지 않았다. *E. coli* 078 경우도 배양 상등액 함유 pH 5.72에서는 800~1200배 성장이 감소되었고, pH 4.92에서는 성장을 보이지 않았다.

**내성 균주의 rifampicin과 ofloxacin의 내성 유지**—Rifampicin, ofloxacin에 내성인 돌연변이 균주를 12개월 동안 2주에 한 번씩 계대하여 MIC를 측정할 결과, MIC가 rifampicin이 >256 µg/ml, ofloxacin이 64 µg/ml로 내성이 유지됨을 알 수 있었다 (Table III).

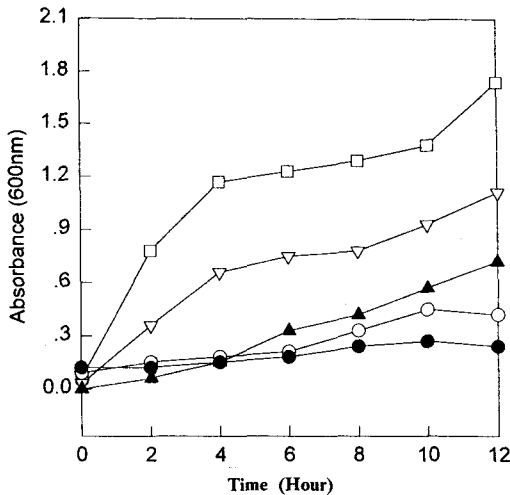
**내성 균주에 rifampicin과 ofloxacin의 불활성화 가능성**—Rifampicin과 ofloxacin에 내성인 *B. bifidum* OFR9를 rifampicin 100 µg/ml, ofloxacin이 25 µg/ml 함유된 배지에서 각각 배양후, 배양액 중에 남아 있는

**Table III**—Maintenance test for rifampicin and ofloxacin resistance of *Bifidobacterium bifidum* strains

Subculture Strain	0		1st	2nd	3rd	4th-10th	11th	after 12 month (MIC; µg/ml)	
	RFR	OFR						RFR	OFR
Parent	1	16	—	—	—	—	—	1	16
RFR 61	>256	16	+	+	+	+	+	>256	16
RFR 9	>256	64	+	+	+	+	+	>256	64

+ : resistant

- : no resistant

**Fig. 4**—Changes in the growth of *E. coli* 078 in the cultivated medium of *B. bifidum* OFR9

- *E. coli* 078 pH 7.0
  - ▽ *E. coli* 078 pH 5.72
  - ▲ *E. coli* 078 pH 4.92
  - *E. coli* 078 pH 5.72
  - *E. coli* 078 pH 4.92
- BL-broth
- BL-broth & culture broth

rifampicin과 ofloxacin의 활성을 측정하여 불활성화 여부를 검토한 결과, Tabel IV에서 보는 바와 같이 내성균 배양액에서 얻은 rifampicin과 ofloxacin에 의해 생긴 각각의 저지원의 크기는 대조균의 배양액에서 생긴 저지원의 크기 및 표준 디스크의 저지원의 크기와 큰 차이가 없었다. 따라서 내성균에 의해 rifampicin과 ofloxacin이 불활성화 되지 않음을 알 수 있었다.

## 고 찰

*B. bifidum* 모균주에 대한 10종의 항결핵제 및 항

**Table IV**—Inactivation test of rifampicin and ofloxacin by *Bifidobacterium bifidum* mutants

Strain	Inhibition zone (mm) <sup>a</sup>		Inactivation	
	RFR	OFR	RFR	OFR
Standard	13 <sup>b</sup>	28 <sup>c</sup>	No	No
Control	11.7 <sup>d</sup>	28 <sup>c</sup>	No	No
RFR 61	10.9	— <sup>f</sup>	No	—
OFR 9	11.7	28	No	No

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

b. Standard inhibition zone by disc containing 10 µg/disc rifampicin

c. Standard inhibition zone by disc containing 5 µg/disc ofloxacin

d. Strain : *Serratia marcescens* ATCC27117

e. Strain : *Escherichia coli* 1130

f. — : Not done

나병제의 최소저지농도를 측정한 결과 rifampicin에 대해서는 MIC가 1 µg/ml로 높은 감수성을 나타냈고, 최근 임상에서 널리 사용되는 fluoroquinolone계 항생제에 대해서도 0.12~16 µg/ml로 비교적 높은 감수성을 나타내었다. 따라서 결핵 및 나병치료의 목적으로 위 항생제를 장기 경구 복용하는 환자에게 *B. bifidum* 제제를 병용투여시 본래의 정상 효과를 기대할 수 없으므로 본래의 정상효과를 그대로 유지하면서 rifampicin과 fluoroquinolone계에 동시에 내성인 균주의 개발이 필요하다. 그 목적으로 모균주를 MNNG처리로 돌연변이시켜 rifampicin에 내성인 *B. bifidum* RFR61 균주를 선발하고, 다시 spontaneous multi-step mutation 방법으로 ofloxacin에도 내성인 *B. bifidum* OFR9균주를 선발하였다. OFR9에 대한 rifampicin의 MIC는 256 µg/ml로 256배 이상 상승하였고, ofloxacin을 포함한 fluoroquinolone계의

MIC는 32~64  $\mu\text{g/ml}$ 로 4~256배 상승하였다. 이러한 현상은 다른 유산균인 *Lactobacillus sporogenes*<sup>16)</sup>와 *Streptococcus faecalis*<sup>17)</sup>경우에서도 관찰되었는데 *B. bifidum*과 동일한 방법으로 내성 균주를 선발하고 MIC를 측정할 결과 *L. sporogenes* 경우 RFP는 256  $\mu\text{g/ml}$ , OFLX는 32  $\mu\text{g/ml}$ 로 증가하였고, *S. faecalis*는 RFP이 >256  $\mu\text{g/ml}$ , OFLX이 128  $\mu\text{g/ml}$ 로 증가하였다. Rifampicin은 이미 항결핵제와 항나병제로 널리 사용되고 있으며, fluoroquinolone계는 broad spectrum 항생제로 그 임상적 사용이 광범위하다. 특히 ofloxacin은 항나병제로도 임상적 연구가 집중되고있다. *B. bifidum* OFR9은 위 두가지 항생제를 포함한 대부분의 항결핵제 및 항나병제와 병용 투여시에도 정상 효과를 기대할 수 있으리라 사료된다. OFR9에 대한 생화학적 특성은 유산 생성능, 생육 억제능을 측정하여 모균주와 비교, 검토하였다. 모균주는 유산을 10.36 mg/ml을 생성하였고, OFR9는 9.27 mg/ml로 유사한 양의 유산을 생성하였으므로 돌연변이로 인한 유산 생성의 변화는 관찰되지 않았다. 장내 세균이 생성하는 유기산은 장내의 pH를 저하시켜 각종 유해 세균의 성장을 억제하고, 장내 정상 세균총을 유지하는데 중요한 역할을 하고 있음이 입증되고 있으며, 이런 유기산의 생성능력을 증가시키기 위하여  $\beta$ -galactosidase의 생성을 증가시키는 돌연변이 균주를 개발하는 연구도 진행되고 있다.<sup>18)</sup> *B. bifidum* 모균주와 돌연변이 균주의 배양 상등액을 함유한 pH 5.72 배지에서 배양한 *E. coli*의 성장은 배양상등액을 포함하지 않은 pH 7.0 배지의 대조군 *E. coli* 성장보다 700~1200배 억제되었다. 배양 상등액을 함유한 pH 4.92의 배지에서는 *E. coli*의 성장을 관찰할 수 없었다. 유기산 생성에 의해서만 *E. coli*의 생육이 억제되는가를 알아보기 위하여 배양 상등액을 가하지 않고 단지 pH만 5.72와 4.92를 맞추어 준 배지에서의 *E. coli*의 성장은 pH 7.0 배지의 대조군에 비하여 pH 5.72에서는 400~600배, pH 4.92에서는 900~1100배 억제되었다. 이로써 pH가 동일한 배지일 경우 배양 상등액을 함유한 배지에서의 *E. coli* 성장이 더욱 억제됨을 알 수 있었다. 장내 병원균인 *Shigella dysenteriae*와 *E. coli* 078의 성장 억제를 *E. coli* NM522와 동일한 방법으로 시험하였을 때, 배양 상등액을 함유한 pH 4.92 배지에서는 역시 성장을 보이지 않았으며, pH 5.72 배지에서는 *Shigella dy-*

*senteriae*의 성장은 400~600배 억제되었고, *E. coli* 078의 성장은 800~1200배 억제되었다. 이로써 모균주와 돌연변이 균주들은 유사한 장내 병원균 생육 억제능을 가지고 있었으며 배양 상등액을 함유한 배지에서의 억제 작용이 더 우수하였다. 유산균에 의한 병원성 세균의 생육 억제 기작은 유산균이 생성하는 유기산에 의한 pH 저하와 유기산 분자의 작용, 항생제 생성에 의한 것으로 알려졌으나, peptide구조로 된 bacteriocin을 비롯한 항균성 물질의 생성에 의한 작용도 인정되고 있다.<sup>19-23)</sup> 본 실험에서의 *E. coli*와 *Shigella dysenteriae*의 생육 억제 효과도 pH 저하 때문만이 아닌 여러 복합적인 요소에 의한 것이라고 사료된다.

선발된 이중 내성 돌연변이 균주인 *B. bifidum* OFR9의 rifampicin과 ofloxacin에 대한 내성유지 시험에서 12개월이 경과한 후에도 MIC가 >256  $\mu\text{g/ml}$  (RFP), 64  $\mu\text{g/ml}$  (OFLX)로 내성이 유지되어 복귀 돌연변이의 가능성은 없었다. 이 내성 균주가 rifampicin과 ofloxacin을 불활성화시킨다면 이 균주를 제제화하여 병용 투여시 항생제 본래의 효과를 얻을 수 없으므로, *in vitro*상에서 rifampicin과 ofloxacin의 불활성화 가능성여부를 검토한 결과 rifampicin과 ofloxacin의 활성이 그대로 유지되어 불활성화될 가능성이 배제되었다.

이상의 연구결과로써 *B. bifidum* OFR9은 rifampicin과 fluoroquinolone계 항생제에 동시에 내성이면서 모균주와 유사한 생화학적 특성을 갖는 우수한 정상 균주로 여겨진다.

## 감사의 말씀

본 연구는 서울대학교 신의약품 개발연구 센터의 지원에 의해 수행된 것으로 지원에 깊이 감사드립니다.

## 문 헌

- 1) Choi, E. C., Ko, S. Y., Kim, H. S., Choi, S. S., Kim, S. K. and Kim, B. K.: Development of *Bifidobacterium bifidum* strains resistant to rifampicin. *Yak-hak Hoeji* 37, 483 (1993).
- 2) Surdre, P., Dam, G. and Kochi, A.: Tuberculosis: a global overview of the situation today. *WHO Bulletin OMS*. 70, 149-159 (1992)

- 3) Ministry of Health & Social Affairs and Korean National Tuberculosis Association.: *Report on the 6th tuberculosis prevalence survey in Korea.* (1990).
- 4) Lowell, S. Y.: Mycobacterial diseases in the 1990s. *J. Antimicrobial Chem.* **32**, 179 (1993).
- 5) WHO : Leprosy situation in world and multidrug therapy coverage. *Weekly Epidemiological Record.* **21**, 153 (1992).
- 6) Chan, G. P., Garia-Ignacio, B. Y., Chavez, V. E., Jimenez, C. L., Parrilla, M. L. R. and Franzblau, S. G.: Clinical trial of sparfoxacin for lepromatous leprosy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 61 (1994).
- 7) Gelber, R. H., Iranmanesh, A., Murry, L., Siu, D. and Tsang, M.: Activities of various quinolone antibiotics against *Mycobacterium leprae* in infected mice *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**, 2544 (1992).
- 8) Franzblau, S. G. and White, K. E.: Comparative in vitro activities of 20 fluorquinolones against *Mycobacterium leprae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**, 229 (1990).
- 9) Committee on Treatment of International Union against Tuberculosis and Lung Disease: Antituberculosis regimens of chemotherapy. *Bull. Int. Union. Tuberc. Lung. Dis.* **63**, 60 (1988).
- 10) Gordon, D., Macrae, J. and Wheeler, D. M.: Lactobacillus preparation for use with antibiotics I-II-III. *Lancet* **1**, 899 (1957).
- 11) Muta, M. and Tanaka, R.: Ecology of Bifidobacterium in the human intestinal flora. *Bifidobacteria Microflora* **6**, 33 (1987).
- 12) Poupard, J. A., Hussain, I. and Norris, R. F.: Biology of the bifidobacteria. *Bacteriol. Rev.* **37**, 136 (1983).
- 13) William, H.: *Official methods of analysis of the association of official analytical chemists.* Benjamin Franklin Station. Washington, DC. p. 245 (1970).
- 14) James, H. T., Richard, W. M. and Gwynn, R. C.: Rapid selection of organisms with increasing resistance on subinhibitory concentration of norfloxacin in agar. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **1**, 188 (1983).
- 15) Sneath, P. U. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. and Holt, J. G.: *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Williams & Wilkins Co., Baltimore, p. 1418 (1986).
- 16) 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 (1989).
- 17) Choi, E. C., Kim, S. H., Kwan, A. R., Lee, M. J., Oh, J. J. and Kim, B. K.: Development of *Streptococcus faecalis* strains resistant to rifampicin. *Yakhak Hoeji* **37**, 350 (1993).
- 18) Kim, Y. M., Lee, J. C., Y. J. and Yang, H. C.: Studies on production of  $\beta$ -galactosidase by *Lactobacillus sporogenes*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **13**, 185 (1988).
- 19) Metha, A.M., Patel, K.A. and Dave, P.J. : (1983) Isolation and purification of an inhibitory protein from *Lactobacillus acidophilus* AC. *Micorbios.* **37**, 37 (1983).
- 20) Suaan, F. B. and Klaehammer, T. R.: Detection and activity lactacin b, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Micorbios.* **45**, 1808 (1983).
- 21) Deklerk, H. C. and Coetzee, J. N.: Antibiosis among lactobacilli. *Nature.* **192**, 340 (1961).
- 22) Roth, L. A., and Keenan.: Acid injury of *E. coli*. *Can. J. Microbiol.* **17**, 1005 (1970).
- 23) Anand, S. K., Srinivasna, R. A. and Rao, L. K.: Antibacterial activity associated with *Bifidobacterium bifidum*-11. *Cultured Dairy Prod. J.* **20**, 21 (1985).