

리팜피신과 오플록사신에 내성인 *Bacillus coagulans* OFR17 균주

김은아 · 오태권 · 최금화 · 이진희 · 백문창 · 김병각 · 최응칠*

서울대학교 약학대학

(Received June 4, 1997)

Bacillus coagulans OFR17 Strain Resistant to Rifampicin and Ofloxacin

Eun-Ah Kim, Tae-Kwon Oh, Keum-Hwa Choi, Jin-Hee Lee,
Moon-Chang Baek, Byong-Kak Kim and Eung-Chil Choi*
College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract—The preparation of *Bacillus coagulans* is used as a therapeutics for human intestinal disorders. However, the bacterium in the preparation is very susceptible to rifampicin and fluoroquinolones. When the preparation is taken with rifampicin or fluoroquinolones, its therapeutic effect can not be expected. So *B. coagulans* RFR17 resistant to rifampicin was obtained by treating the parent *B. coagulans* with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *B. coagulans* OFR17 was produced by serial passage of *B. coagulans* RFR17 on agar with 2-fold minimal inhibitory concentration of ofloxacin or ciprofloxacin. *B. coagulans* OFR17 was resistant to fluoroquinolones up to 16~64 fold higher than that for the original strain. *B. coagulans* OFR17 also exhibited identical characteristics with the parent strain when they were tested for lactic acid production and growth inhibition of *E. coli* MB4-01 and *Shigella sonnei* MB4-10411. From *in vitro* test, it was also identified that rifampicin and ofloxacin are not inactivated by certain factors of *B. coagulans* OFR17. Conclusively, *B. coagulans* OFR17 can be regarded as a promising strain which can be developed as the preparation for the treatment of the intestinal disorders of the tuberculosis patients under rifampicin and ofloxacin therapy.

Keywords □ *Bacillus coagulans* OFR17, rifampicin, fluoroquinolones, multi-step mutation, resistance.

유산을 생성하는 *Bacillus coagulans*, *Lactobacillus bifidus*, *Lac. acidophilus*¹⁾, 낙산을 생성하는 *Clostridium butyricum*²⁾, 그리고 *Bacillus mesentericus* 등은 소장이나 대장에서 유해균의 증식을 억제할 뿐만 아니라 유해균이 생성하는 유해물질(부패산물, 독소 등)을 감소시켜 정장효과를 나타냄으로써 장내 건강을 유지시켜 준다.

한편 결핵환자 및 나병환자가 항결핵제 또는 항나병제를 장기복용하는 경우에는 장내 정상 세균총이 파괴되어 흡수부진, 소화불량 등의 장질환을 일으킬 수 있으므로 위의 약물과 정장용 생균제제를 병용하는 것이

바람직하다고 Gordon³⁾ 등이 보고한 바 있다. 그런데 이때 사용되는 약물들이 정장용 균주를 사멸시키거나, 반대로 정장균주가 약물을 불활성화시키게 되면 이들 정장용 균주는 정장제로서의 효용성을 잃게 된다. 따라서 본 연구에서는 정장균주로 사용중인 *B. coagulans*가 리팜피신이나 오플록사신등 항결핵제와 항나병제에 감수성인 바 이 균주를 이 항균, 항생제에 내성을 갖는 균주로 돌연변이시켜 결핵 및 나병환자의 장내 질환을 치료 또는 개선시킬 수 있는 정장균주를 개발하고자 하였다.

본 실험에 앞서 *B. coagulans*에 대한 13종의 항결핵제 및 항나병제의 최소저지농도(MIC)를 측정한 결과 모균주가 리팜피신과 오플록사신에 대해 감수성을 갖고 있음이 밝혀졌다. 본 실험에서는 N-methyl-N'-nitro-

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-880-7874 (팩스) 02-886-5802

N-nitrosoguanidine(MNNG) 처리로 얻은 리팜피신 내성균주 *B. coagulans* RFR17¹¹을 다단계 자연돌연변이 방법으로 처리하여 플로로퀴놀론계 항균제에도 내성을 나타내는 이중 내성균주인 *B. coagulans* OFR17을 얻었다. 이 균주에 대하여 정장용 생균제제로서의 개발 가능성을 검토하기 위하여 유기산생성능, *E. coli*와 *Shigella sonnei* 등의 장내 세균 생육 억제능등의 생리적, 생화학적 특성을 모균주와 비교, 검토하였다. 또한 이중 내성균주에 의하여 리팜피신과 오플록사신이 불활성화 된다면 항생물질의 치료 목적을 달성할 수 없으므로 *in vitro* 실험을 통해서 그 가능성을 알아보았다.

실험방법

실험균주 - 본 실험에서는 일동제약에서 분양받은 *Bacillus coagulans*(=*Lactobacillus sporogenes*) 균주를 변형시킨 리팜피신 내성균주 *B. coagulans* RFR17 균주⁴⁾를 사용하였다. 그 외의 균주로는 본 연구실에서 보관하고 있는 *E. coli* MB4-01, *Shigella sonnei* MB4-10411, *E. coli* MB4-5376, *B. subtilis* ATCC 6633, *Serratia marcescens* ATCC 27117을 사용하였다.

배지 - *B. coagulans* 생육 배지로는 TJB medium (glucose 10 g, yeast extract 10 g, peptone 10 g, sodium acetate 10 g, B-salts 5 ml, dH₂O q.s. : total vol. 1 l, pH 6.8)을 사용하였으며, 그 외의 균주의 생육 배지로는 Mueller-Hinton (MH medium, Difco Co., Michigan, U.S.A.)을 사용하였다. 장내 세균 생육 억제 실험시 *E. coli* 선택 배지로는 EMB agar(Difco Co.) medium을 사용하였고, *S. sonnei* 선택 배지로는 MacConkey agar(Difco Co.) medium을 사용하였다.

최소 저지 농도(MIC)의 측정 - 본 실험에서는 rifampicin(RFP), kanamycin, isoniazid, ethambutol, ofloxacin(OFLX), norfloxacin(NFLX), ciprofloxacin(CFLX), sparfloxacin (SFLX), rufloxacin (RFLX), lomefloxacin(LMFX), levofloxacin(LV-FX), 등의 항결핵제 및 항나병제로 사용중이거나 개발 중인 항생, 항균제를 사용하였다. TJB에 전 배양한 균액을 10⁶CFU/ml로 희석하여 2-fold 액체 희석법으로 MIC를 측정하였다. 37°C에서 18시간 배양한 후 균의 성장을 관찰할 수 없는 최소 농도를 MIC로 하였다.

이중 내성균주의 선발 - TJB에 보관 중인 리팜피신

내성균주인 *B. coagulans* RFR17을 37°C에서 배양한 후 다시 TJB에서 중간대수기까지 배양하고 6000×g에서 5분간 원심분리하였다. 상등액을 버리고 10¹⁰CFU/ml로 모아 10 μg/ml의 리팜피신과 2-fold MIC 농도의 오플록사신을 함유한 고체 배지에 100 μl씩 가하여 37°C에서 39~48시간 배양하고 돌연변이 집락을 선발하였다. 선발된 돌연변이균주에 대하여 오플록사신의 MIC를 측정 한 후, 다시 10 μg/ml의 리팜피신과 2-fold MIC 농도의 시플록사신부터 단계별로 시플록사신의 농도가 높은 배지로 점차 옮기면서 배양하였다.

돌연변이균주의 내성 유지 시험 - 이들에 한번씩 2주간 계대하여 각 항생물질의 MIC를 측정하여 내성이 소실되는지의 여부와 초기의 MIC가 그대로 유지되는지 여부를 확인하였다.

산도정량 - 37°C에서 하룻밤 전배양한 모균주와 돌연변이균주를 새로운 TJB에 2.5% 접종하고 37°C, 36시간 정치배양하였다. 배양액을 6000×g에서 5분간 원심분리한 후 얻은 상등액을 멸균 증류수로 5배 희석하여 1% phenolphthalein 용액을 지시약으로 0.1 N NaOH 용액으로 적정하였다.

장내 세균 생육 억제 시험 - *B. coagulans* 모균주와 돌연변이균주 및 *E. coli* MB4-01을 전배양한 후, 모균주 또는 돌연변이균주와 *E. coli*를 10:1과 100:1의 비율로 37°C에서 혼합배양하고 대조로는 *E. coli*만을 배양하였다. 접종 후 0시간, 3시간, 6시간, 9시간, 12시간 그리고 24시간에 균액을 취하여 일정 단계로 희석한 후 *E. coli* 선택 배지인 EMB agar 배지에 접종한 후 37°C, 24시간 배양하여 성장한 균 집락을 세어 *E. coli*에 대한 생육 억제능을 측정하였다.

S. sonnei MB4-10411에 대하여도 *E. coli* 생육 억제 시험과 동일한 방법으로 실험하였다.

내성균주에 의한 오플록사신의 불활성화 가능성에 대한 시험 - *B. coagulans* OFR17을 전 배양한 후 오플록사신이 50 μg/ml 함유된 TJB에서 18시간 배양하고 원심분리하여 상등액으로 5 μg/disc 농도의 오플록사신 디스크를 만들어 *B. subtilis* ATCC 6633 균주를 함유하는 평판 위에 놓아 고정시키고 16시간 배양한 후 생긴 저지원의 크기를 표준 검량 곡선에 나타난 저지원의 크기와 비교하여 불활성화 여부를 확인하였다. 이때 대조균으로는 오플록사신에 비감수성인 *E. coli* MB4-5376와 리팜피신에 비감수성인 *Serratia marcescens* ATCC 27117 균주를 사용하였다.

Table I— Minimal inhibitory concentrations of antituberculosis agents and fluoroquinolones against *B. coagulans* strains

Drug/Strain	Parent	RFR17	OFR17
Rifampicin	<0.03*	>512	>512
Kanamycin	4	4	32
Isoniazid	>512	>512	>512
Ethambutol	>512	>512	>512
Pyrazinamide	>512	>512	>512
D-cycloserine	>512	>512	>512
Ofloxacin	2	2	128
Norfloxacin	32	32	>512
Ciprofloxacin	1	1	64
Sparfloxacin	0.25	0.25	64
Rufloxacin	8	8	128
Lomefloxacin	4	4	>128
Levofloxacin	0.5	0.5	32

* Minimal inhibitory concentrations ($\mu\text{g/ml}$) of drugs

실험결과

***B. coagulans*에 대한 항결핵제 등의 MIC** - *B. coagulans* 모균주, RFR17, OFR17에 대한 13종의 항결핵제 및 항나병제의 최소 저지 농도를 Table I에 나타내었다. *B. coagulans* 모균주는 리팜피신에 대하여 매우 높은 감수성을 나타내었고, 플로로퀴놀론계 항균제에 대하여 MIC가 0.25~32 $\mu\text{g/ml}$ 로 감수성 정도가 다양했으나, 대부분 높은 감수성을 보였다. *B. coagulans* RFR17 균주에 대한 리팜피신의 MIC는 모균주에 비해 15,000배 이상 상승하였고, 플로로퀴놀론계 항균제의 MIC는 모균주와 같았다. *B. coagulans* OFR17 균주에 대한 플로로퀴놀론계 항균제의 MIC를 측정된 결과 모균주와 RFR17 균주에 비해 OFLX, RFLX는 8배, PFLX, LMF, LVFX, RSFX, TSFX는 16배, CPF, NFLX, SPFX는 64배 상승하였다.

이중내성균주의 분리 - 리팜피신 내성균주 *B. coagulans* RFR17 균주에 대하여 spontaneous multi-step mutation 방법을 사용하여 리팜피신과 오플록사신에 이중 내성인 돌연변이균주를 선발하여 *B. coagulans* OFR17이라 명명하고, 이에 대하여 유기산 생산량, 장내 세균 생육 억제 시험을 진행하였다.

내성균주의 내성 유지 - 리팜피신과 플로로퀴놀론계 항생제에 내성인 *B. coagulans* OFR 17균주를 2개월 동안 이틀에 한번씩 교체하여 MIC를 측정된 결과, 2개월 후에도 리팜피신의 MIC는 512 $\mu\text{g/ml}$, 오플록사신의 MIC는 128 $\mu\text{g/ml}$ 로 내성이 유지되었다.

유기산 생성량 - 모균주 및 돌연변이균주에 의하여

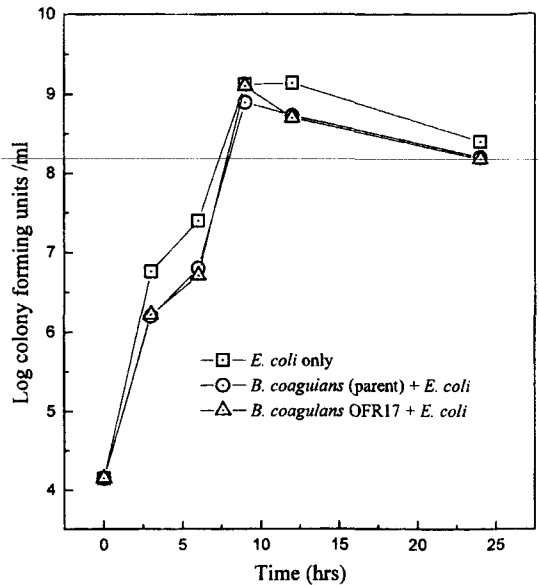


Fig. 1— Growth curve of *E. coli* MB4-01 which was grown with *B. coagulans* strains. (*E. coli* : *B. coagulans* = 1:10)

생성되는 유기산량을 측정, 비교한 결과 돌연변이균주의 유산 생성량은 5.18 mg/ml로 모균주와 비교하여 99.2%로서 비슷한 생성량을 보였다.

장내 세균 *E. coli* MB4-01 생육 억제 - *B. coagulans* 균주가 장내 유해균의 성장을 어느 정도 억제하는가를 알아보기 위하여 임상 분리 병원성 *E. coli* MB4-01을 대상으로 하여 *B. coagulans* 모균주 및 돌연변이균주에 의한 생육 억제능을 비교, 검토하였으며, 그 결과를 Fig. 1, 2에 나타내었다.

*E. coli*와 *B. coagulans*를 1:10의 비율로 혼합배양 시 배양초기에는 대조군에 비해 큰 차이를 보이지는 않았으나, 24시간 경과시에는 *B. coagulans* 모균주, 내성균주 모두 *E. coli* 단독배양시보다 약 2~2.2배 정도 균수의 감소를 보였다(Fig. 1). *E. coli* : *B. coagulans*를 1:100의 비율로 혼합 배양시에는 3시간 경과 후부터 급격한 *E. coli*의 생육억제가 이루어졌고, 24시간 경과시에는 모균주, 내성균주 모두 약 10^5 배 정도 *E. coli* 성장을 억제하였다(Fig. 2).

장내 세균 *Shigella sonnei* MB4-10411 생육 억제능 - *S. sonnei*와 *B. coagulans*를 1:10의 비율로 혼합 배양 시 6시간 경과 후부터 *S. sonnei*의 생육 억제가 이루어졌고, 내성 균주에 의한 생육 억제가 더 빠르게 나타났다. 24시간 경과시에는 *B. coagulans* 모균주, 내성균

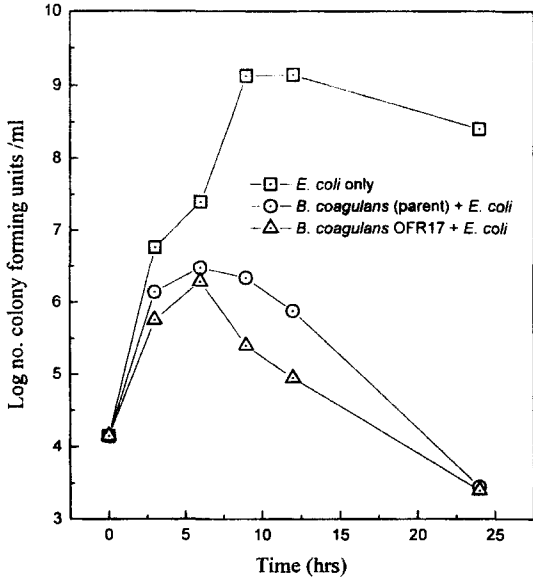


Fig. 2—Growth curve of *E. coli* MB4-01 which was grown with *B. coagulans* strains. (*E. coli* : *B. coagulans* = 1:100)

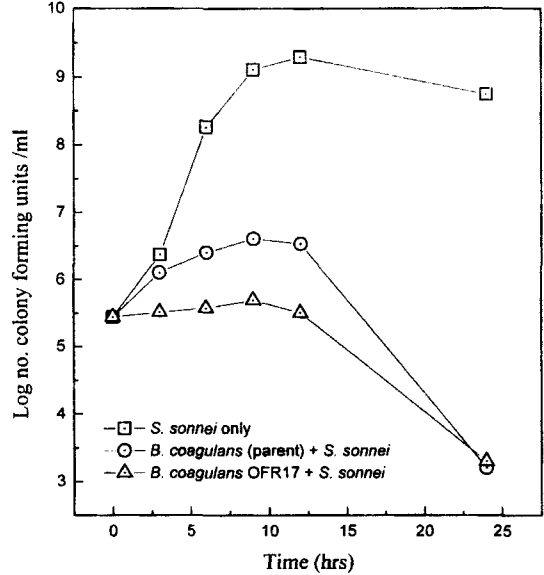


Fig. 4—Growth curve of *S. sonnei* MB4-10411 which was grown with *B. coagulans* strains. (*S. sonnei* : *B. coagulans* = 1:100)

주 모두 *S. sonnei* 단독 배양시보다 약 10배 정도 *S. sonnei* 균수의 감소를 보였다(Fig. 3). *S. sonnei*와 *B. coagulans*를 1:100의 비율로 혼합 배양시에는 3시간 경과후부터 급격한 *S. sonnei*의 생육 억제가 이루어졌고,

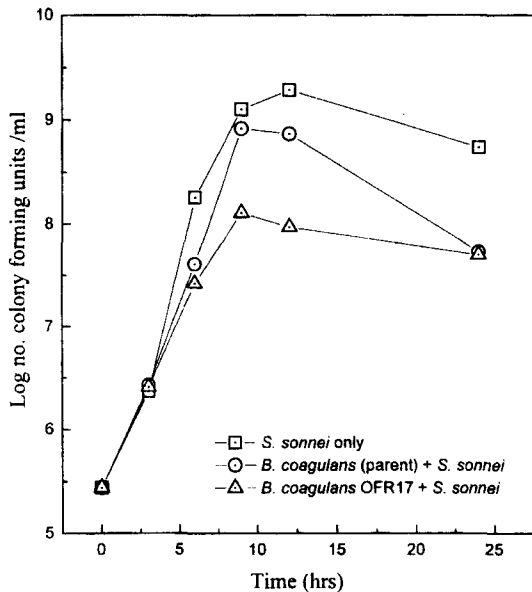


Fig. 3—Growth curve of *S. sonnei* MB4-10411 which was grown with *B. coagulans* strains. (*S. sonnei* : *B. coagulans* = 1:10)

24시간 경과시에는 모균주, 내성균주 모두 $2.5 \sim 3.7 \times 10^5$ 배 정도 *S. sonnei* 성장을 억제하였다(Fig. 4).

내성균주에 의한 오픈록사신의 불활성화 가능성 - 리팜피신과 오픈록사신에 내성인 *B. coagulans* OFR17을 리팜피신 50 $\mu\text{g/ml}$, 오픈록사신 50 $\mu\text{g/ml}$ 이 함유된 배지에서 각각 배양 후, 배양액 중에 남아 있는 오픈록사신의 활성을 측정하여 불활성화 여부를 검토한 결과, 내성균 배양액에서 회수한 리팜피신과 오픈록사신에 의해 생긴 각각의 저지원의 크기는 대조균의 배양액에서 회수한 항생물질에 의해 생긴 저지원의 크기 및

Table II—Inactivation test of rifampicin by *B. coagulans* mutant

Strains	Growth inhibition zone (mm) ^a		Inactivation	
	RFP	OFLX	RFP	OFLX
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 27117	20.5		No	
<i>Escherichia coli</i> MB4-5376		23.5		No
<i>B. coagulans</i> ORF17	20.3	23.3	No	No
Standard disc	21.6 ^b	24.9 ^c		

^a The size of growth inhibition zone against *B. subtilis* ATCC 6633 by rifampicin and ofloxacin within the centrifuged culture of bacteria.

^b Growth inhibition zone by 10 $\mu\text{g/disc}$ rifampicin

^c Growth inhibition zone by 5 $\mu\text{g/disc}$ ofloxacin

표준 디스크에 의해 생성된 저지원의 크기와 큰 차이가 없었다(Table II). 따라서 내성균에 의해 오폐물사신이 불활성화 되지 않았다고 사료된다.

고 찰

B. coagulans 모균주에 대한 13 종의 항결핵제 및 항나병제의 최소 저지 농도를 측정한 결과 리팜피신에 대해서는 MIC가 $<0.03 \mu\text{g/ml}$ 로 매우 높은 감수성을 나타내었고, 최근 임상에 널리 사용되고 있는 플로로퀴놀론계 항균제에 대해서도 $0.25 \sim 32 \mu\text{g/ml}$ 로 비교적 높은 감수성을 나타내었다. 따라서 결핵 및 나병 치료의 목적으로 위 항생, 항균제를 장기 경구 복용하는 환자에게 *B. coagulans* 모균주 제제를 병용 투여하면 본래의 정상 효과를 기대할 수 없으므로 본래의 정상 효과를 그대로 유지하면서 리팜피신과 플로로퀴놀론계 항균제에 동시에 내성을 갖는 균주의 개발이 필요하다. 그 목적으로 본 실험실에서 보유하고 있는 리팜피신 내성균주 *B. coagulans* RFR17⁴⁾을 spontaneous multi-step mutation 방법으로 처리하여 오폐물사신에도 내성인 이중 내성균주 *B. coagulans* OFR17 균주를 선발하였다.

B. coagulans OFR17에 대한 리팜피신의 MIC는 $>512 \mu\text{g/ml}$ 로 RFR17 균주와 마찬가지로 15,000배 이상의 내성이 유지되었고, 오폐물사신을 포함한 플로로퀴놀론계 항균제의 MIC는 $32 \sim 256 \mu\text{g/ml}$ 로 16~64배 이상 상승하였다. 리팜피신은 이미 항결핵제와 항나병제로 널리 사용되고 있으며, 플로로퀴놀론계 항균제는 광범위 항균제로 그 임상적 사용이 광범위하다. 특히 오폐물사신은 항나병제로도 임상적 연구가 집중되고 있다.^{5,6)} MIC치로 볼 때 *B. coagulans* OFR17제제는 위 두가지 항생, 항균제를 포함한 대부분의 항결핵제 및 항나병제와 병용 투여 시에도 정상 효과를 기대할 수 있으리라 생각된다.

B. coagulans OFR17에 대한 생화학적 특성은 유산 생성능, 장내 세균 생육 억제능을 측정하여 모균주와 비교, 검토하였다. 모균주는 유산을 5.22 mg/ml 생성하였고, 내성 돌연변이균주는 5.18 mg/ml 로 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 있다.^{7,8)}

모균주 및 내성 돌연변이균주의 장내 세균 *E. coli*에 대한 *in vitro* 생육 억제 실험 결과, *E. coli*와 *B. coagulans*를 1:10의 비율로 혼합 배양했을 경우, *E. coli* 단독 배양시보다 모균주, 내성균주 모두 약 2배 정도 대장균 수의 감소를 보였으나, 1:100의 비율로 혼합 배양시에는 모균주, 내성균주 모두의 경우 10^5 배 정도의 대장균 수의 감소를 보였다. 또한 모균주와 내성 돌연변이균주의 장내 세균 *S. sonnei*에 대한 *in vitro* 생육 억제 실험의 경우도 *E. coli*의 경우의 결과와 거의 같은 결과를 보였다. 이러한 *B. coagulans*에 의한 장내유해 세균의 성장억제 효과는 *Enterococcus faecalis* 균주나 *Bifidobacterium bifidum*에 의해서도 같은 정도로 나타났다.^{9,10)} 그러나, *B. coagulans*의 경우 1:100으로 혼합배양했을 때 10^5 배나 억제한 것은 특이한 것이었다. 내성 돌연변이균주도 모균주와 유사한 장내 세균 억제능을 가지고 있는 것으로 나타나 내성돌연변이에 의해 정상균주의 특징인 장내유해균주의 성장억제능이 변화받지 않는 것으로 사료된다. 유산균에 의한 세균의 생육 억제 효과는 유산균이 생성하는 유기산에 의한 pH 저하와 유기산 분자의 작용, 항생제 생성, H_2O_2 생성 및 polypeptide 구조로 된 항균성 물질 bacteriocin에 의해 나타난다고 보고된바 있다.^{7,8,11~13)} 본 실험에서의 *E. coli*와 *S. sonnei*에 대한 생육 억제 효과도 pH 저하 때 문만이 아닌 여러 복합적인 요소에 의한 것이라고 생각되어진다. Tramer¹⁴⁾ 등은 *Lac. acidophilus*의 경우 pH 4.2 이상에서는 *E. coli* 억제능이 거의 없다고 보고한 바 있다. 따라서, 본 실험에서 혼합배양 초기에 나타난 억제 효과는 pH보다는 그 외 다른 요인에 의해 나타난 것으로 생각된다.

본 연구에서 선발한 이중 내성균주 *B. coagulans* OFR17의 리팜피신과 오폐물사신에 대한 내성 유지 실험에서 2주 동안 항생제가 함유되지 않은 배지에서 subculture한 후에도 MIC가 $>512 \mu\text{g/ml}$ (rifampicin), $128 \mu\text{g/ml}$ (ofloxacin)로 유지되어 복귀 돌연변이로 인한 내성 소실의 가능성은 없는 것으로 사료되었다. 내성균주가 리팜피신과 오폐물사신을 불활성화시킨다면 이 균주를 제제화하여 병용 투여시에 항생제 본래의 효과를 얻을 수 없으므로, *in vitro* 상에서 이중 내성균주에 의한 리팜피신과 오폐물사신의 불활성화 여부를 검토한 결과 리팜피신과 오폐물사신의 활성이 그대로 유지되어 불활성화 되지 않음을 알 수 있어 실용상 큰 문제가 없을 것으로 사료된다.

이상의 연구 결과로써 *B. coagulans* OFR17은 리팜피신과 플로로퀴놀론계 항생제에 동시에 내성이면서 모균주와 유사한 생화학적 특성들을 갖는 우수한 정장균주로 여겨져 의약품으로 개발할 가치가 있다고 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 보건복지부의 보건의료기술 연구개발사업에 의한 지원과 서울대학교 신의약품 개발 연구 센터를 통한 한국과학재단 우수연구센터지원금 일부에 의해 수행된 것으로 지원에 깊이 감사드립니다.

문헌

- 1) Choi, S. S. : Development of *Clostridium butyricum* resistant to rifampicin. M. Sc. Thesis, Seoul Natl. Univ. (1988).
- 2) Kim, H. S., Choi, S. S., Choi, E. C., Kim, B. K., Lee, J. C. and Kim, T. H. : Development of *Lactobacillus sporogenes* resistant to rifampicin, an antituberculosis agent. *Kor. J. Microbiol.* **27**, 155 (1989).
- 3) Gordon, D., Macrae, J. and Wheeler, D. M. : Lactobacillus preparation for use with antibiotics I-II-III. *Lancet* **1**, 899 (1987).
- 4) Choi, E. C., Kim, S. H., Kwon, 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).
- 5) Frantz, S. G. and White K. E. : Comparative in vitro activities of 20 fluoroquinolones against *Mycobacterium leprae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**, 229 (1990).
- 6) 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).
- 7) Deklerk, H. C. and Coetzee, J. N. : Antibiosis among lactobacilli. *Nature* **192**, 340 (1961).
- 8) Roth, L. A. and Keenan. : Acid injury of *E. coli*. *Can. J. Microbiol.* **17**, 1005 (1970).
- 9) 이수화, 김숙경, 정영자, 심미자, 김병각, 최웅철 : 리팜피신과 오플로삭신에 내성인 *Enterococcus faecalis* 균주의 개발. *약학회지* **40**, 351 (1996).
- 10) Y. J. Chung, S. K. Kim and E. C. Choi : The effects of *Bifidobacterium bifidum* OFR9 strain resistant to antituberculosis and antileprosy agents on the fecal flora in mice. *J. Gener. Appl. Microb.* **43**, 61 (1997).
- 11) Anad, S. K., Simivasna, R. A. and Rao, L. K. : Antibacterial activity associated with *Bifidobacterium bifidum*-11. *Cultured Dairy Prod. J.* **20**, 21 (1995).
- 12) Metha, A. M., Patel, K. A. and Dave, P. J. : Isolation and purification of an inhibitory protein from *Lactobacillus acidophilus*. *AC. Microbios.* **37**, 37 (1983).
- 13) 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).
- 14) Tramer, J. : Inhibitory effect of *Lactobacillus acidophilus*. *Nature* **211**, 204 (1966).