



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년06월14일
(11) 등록번호 10-1747347
(24) 등록일자 2017년06월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/04 (2017.01) C12Q 1/44 (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-7010006
(22) 출원일자(국제) 2010년09월16일
심사청구일자 2015년09월08일
(85) 번역문제출일자 2012년04월18일
(65) 공개번호 10-2012-0099214
(43) 공개일자 2012년09월07일
(86) 국제출원번호 PCT/FR2010/051925
(87) 국제공개번호 WO 2011/033224
국제공개일자 2011년03월24일
(30) 우선권주장
09/04470 2009년09월18일 프랑스(FR)
(56) 선행기술조사문헌
US07309580 B2*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
비오메리외
프랑스공화국, 에프-69280 마르씨-레두왈, 슈멩 드 로르므
(72) 발명자
셀리에, 마리
프랑스공화국, 에프-38390 몽파리외 베르씨외, 루프 드 삼빠뉴 5
밀스, 존
미합중국, 63026 미주리, 팬톤, 월넷 리지 730
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인오리진

전체 청구항 수 : 총 15 항

심사관 : 윤준호

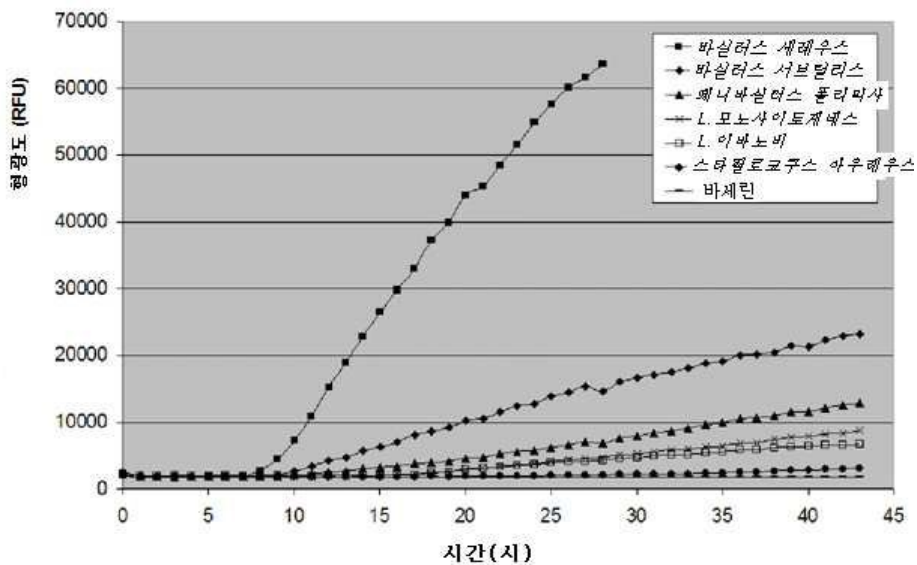
(54) 발명의 명칭 **바실러스 세레우스 그룹으로부터 박테리아를 검출하는 방법**

(57) 요약

본 발명은 식품의 미생물학적 시험에 관한 것이다. 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, **바실러스 세레우스** 그룹 박테리아를 확인하는 방법에 관한 것이다:

- 반응용기 내에서 **바실러스 세레우스** 그룹의 박테리아를 함유할 수 있는 샘플, 하나 이상의 발색성 포스포티딜 (뒷면에 계속)

대표도 - 도1



콜린 포스포리파제 C 기질을 포함하는 반응 배지 및 그람-음성 박테리아의 억제제를 접촉시키는 단계;

- 상기 성분들 모두를 함께 배양하는 단계;
- 상기 PC-PLC 기질 가수분해 반응을 검출함으로써 *바실러스 세레우스* 그룹의 박테리아를 확인하는 단계,

여기서, 상기 샘플 내에 잠재적으로 존재하는 *바실러스 세레우스* 그룹에 속하는 박테리아 이외의 다른 그람-양성 박테리아에 의한 PC-PLC 기질의 가수분해가 검출될 수 있기 전에 *바실러스 세레우스* 그룹의 박테리아에 의한 상기 가수분해 반응이 검출되는 방식으로, 상기 반응 배지의 pH 및 상기 수행된 PC-PLC 기질 가수분해 반응을 검출하기 위해 필요한 시간이 조정된다.

(72) 발명자

모스티폰느, 다비드

프랑스공화국, 에프-69280 썬뜨 콩소르스, 뒤 마르
셀 메리외 115

오렝가, 실뱅

프랑스공화국, 에프-01160 느빌르 쉬르 앵, 썬-앙
드레 르 바, 루뜨 뒤 썬랭 164

비몽, 앙투완느

프랑스공화국, 에프-69005 리용, 뒤 드 라 파보리
뜨 56

명세서

청구범위

청구항 1

하기 단계를 포함하는, *바실러스 세레우스* 그룹의 박테리아를 확인하는 방법:

- 반응용기 내에서, *바실러스 세레우스* 그룹의 박테리아를 함유할 수 있는 샘플, 하나 이상의 형광성 PC-PLC 기질을 포함하는 반응 배지 및 그람-음성 박테리아의 억제제를 접촉시키는 단계;
- 샘플, 반응 배지 및 그람-음성 박테리아의 억제제 모두를 함께 배양하는 단계;
- 상기 PC-PLC 기질 가수분해 반응을 검출함으로써 *바실러스 세레우스* 그룹의 박테리아를 확인하는 단계,

여기서, 상기 샘플 내에 잠재적으로 존재하는 *바실러스 세레우스* 그룹에 속하는 박테리아 이외의 다른 그람-양성 박테리아에 의한 PC-PLC 기질의 가수분해가 검출될 수 있기 전에, *바실러스 세레우스* 그룹의 박테리아에 의한 상기 가수분해 반응이 검출되는 방식으로, 상기 반응 배지의 pH 및 상기 PC-PLC 기질 가수분해 반응을 검출하기 위해 필요한 시간이 조정되며,

상기 반응 배지의 pH는 6.8 내지 8.0이고,

상기 PC-PLC 기질 가수분해 반응을 검출하기 위해 필요한 시간이 6 내지 30 시간인 것을 특징으로 함.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 반응 배지는 액체, 겔 또는 고체 형태인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 반응 배지가 배양 배지인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 샘플을 농축하는 이전 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 반응 배지가 두번째 기질로서 하나 이상의 발색성 기질 또는 형광성 기질을 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 두번째 기질이 *바실러스 안트라시스*를 *바실러스 세레우스*, *바실러스 투린지엔시스*, *바실러스 웨이헨스테판네시스*, *바실러스 마이코이테스* 및 *바실러스 슈도마이코이테스*와 구별할 수 있게 하는 PI-PLC 기질인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 *바실러스 세레우스* 그룹의 박테리아의 카운팅이 또한 가능한 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 반응용기가 마이크로플레이트, 마이크로웰, 마이크로튜브, 모세관 및 멀티웰 카드로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 형광성 PC-PLC 기질이 4 MU-CP(4-메틸움벨리페릴 콜린 포스페이트: 4-methylumbelliferyl choline phosphate)에 대응하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 *바실러스 세레우스* 그룹의 박테리아가 *바실러스 세레우스*, *바실러스 안트라시스*, *바실러스 투린지엔시스*, *바실러스 마이코이데스*, *바실러스 슈도마이코이데스* 및 *바실러스 웨이헨스테판네시스*로부터 선택되고, 상기 *바실러스 세레우스* 그룹에 속하는 박테리아 이외의 다른 그람-양성 박테리아가 *리스테리아 모노사이토게네스*, *리스테리아 이바노비*, *스타필로코쿠스* 또는 *바실러스 spp.* 속의 다른 종으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 방법을 수행하기 위한, 선택적 반응 배지 또는 비선택적 반응 배지를 포함하는 진단키트로서,

상기 배지가 하나 이상의 그람-음성 박테리아의 억제제 및 형광성 PC-PLC 기질을 포함하는 것인, 진단키트.

청구항 12

제11항에 있어서,

마이크로플레이트, 마이크로웰, 마이크로튜브, 모세관 및 멀티웰 카드로 이루어진 군으로부터 선택되는 반응용기를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 진단키트.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 형광성 PC-PLC 기질이 4 MU-CP(4-메틸움벨리페릴 콜린 포스페이트: 4-Methyl umbelliferyl choline phosphate)에 대응하는 것을 특징으로 하는 진단키트.

청구항 14

제11항에 있어서,

상기 반응 배지가 두번째 기질로서 하나 이상의 발색성 기질 또는 형광성 기질을 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 진단키트.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 두번째 기질이 *바실러스 안트라시스*를 *바실러스 세레우스*, *바실러스 투린지엔시스*, *바실러스 웨이헨스테판네시스*, *바실러스 마이코이데스* 및 *바실러스 슈도마이코이데스*와 구별할 수 있는 PI-PLC 기질인 것을 특징으로 하는 진단키트.

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 식품의 미생물학적 시험 분야에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 레시티나제(lecithinase) 또는 하기에 PC-PLC로 언급되는 포스파티딜콜린 포스포리파제 C(phosphatidylcholine phospholipase C)에 대한 형광성 기질의 가수분해에 의해, *바실러스 세레우스* 그룹의 박테리아와 다른 박테리아를 구별하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 식품 가공 분야의 미생물학적 시험은 미생물의 검출 및/또는 확인 및/또는 카운팅을 할 수 있는 기법들의 수행을 필요로 하며, 그 결과는 가능한 한 신속하게 제공되어야 한다. 상기 미생물들은, 기술적 관심 대상, 예를 들어 발효인 박테리아 또는 품질 지표(quality indicator)와 같이 비병원성일 수 있고; 상기 품질 지표는 원재료 또는 조생성물로부터 최종 생성물까지의 생성 과정을 입증할 수 있게 한다. 그럼에도 불구하고, 통상적으로 상기 미생물들은 대부분 병원성이고, 추정되는 오염물들의 신속하고 정확한 검출은 단계를 보정할 수 있게 한다. 선택적으로, 상기 미생물에 의해 생성되고 병원성 효과의 원인이 되는 독소가 조사될 수 있다.

[0003] 임상 진단은 동일한 기법: 박테리아 자체의 검출 및/또는 카운팅, 또는 독소의 검출을 이용한다. 어떠한 경우라도, 진단 시험에 중요한 인자는 획득되는 결과에 대한 민감성, 선택성 및 시간이다.

[0004] *바실러스* 속(*Bacillus* genus)은 자연의 도처: 땅, 물, 공기, 곡물에서부터 분말유, 밀가루 제품, 향신료에 이르는 식품에도 존재하는 그람-양성 박테리아를 포함한다. 포자를 형성하는 능력은 그들에게 외부 환경에 대한 매우 우수한 저항성을 제공한다. 특히, *바실러스 세레우스*(*B. cereus*)의 포자는 원재료에서부터 제조된 생산물에 이르는 식품을 오염시킬 수 있다. 상기 포자는 먹이 사슬의 시기 동안 생존한다. 정상적인 환경하에서, *B. 세레우스*는 식품의 그램당 10^3 개의 세포수 미만의 양으로 존재하며, 병원성 효과를 나타내지 않는다. 병원성 수준의 최소값은 식품의 그램당 10^5 개의 세포수를 초과한다. 따라서, 식품에 의한 개체의 오염은 위장병(gastroenteritis)의 원인이 될 수 있다. *B. 세레우스*와 관련된 위장병은 구토나 설사를 유발한다. 다양한 식품: 고기, 쌀, 건조 곡식, 소스, 스프 등에 원인이 있을 수 있다. 기회감염성 *B. 세레우스* 감염은 또한 약한 환자, 예를 들어 알콜중독자 또는 면역 약화된 환자 또는 화상과 같은 상처가 따르는 환자에게서 관찰될 수 있다.

[0005] 따라서, *바실러스 세레우스* 그룹의 박테리아 검출 및 정량화는 식품-가공 산업의 시험 연구 및 임상 진단 연구에 필수적이다. 표준 방식으로, 분리는 통상적인 선택적 플레이팅 배양 배지: 예를 들어, ISO(국제 표준화 기구: International Organization for Standardization) 표준형 또는 폴리믹신 난황 만니톨 브로모티몰 블루 한천(PEMBA: polymyxin egg yolk mannitol bromothymol blue agar) 또는 만니톨-난황-폴리믹신 한천(MYP: mannitol-egg yolk-polymyxin agar)과 같은 추천된 배지인 BAM-FDA(식품의약품안전청의 세균 분석 매뉴얼: Bacteriological Analytical Manual of the Food and Drug Administration)법으로 수행된다. 확인은 형태학적 특성 및 배양 특성 또는 대사 특성에 따라 수행된다.

[0006] 상기 PEMBA 또는 MYP 배지는 매우 비효율적인 억제제 시스템에 연결된 잠재적인 위양성(false positive)을 야기하거나, 또는 특정 균주의 키(key) 형태학적 특성 및 대사 특성의 가능한 부재에 연결된 위음성(false negatives)을 야기할 수 있다. 결국, 일부 균주는 문헌 [Fricker et al., International Journal of Food Microbiology; 121 (2008): 27-34]에 기재된 바와 같이 모호한 반응을 나타낸다. 위음성을 극복하기 위하여 발색성 플레이팅 배지가 개발되어 왔으며: 여기에는 발색성 천연 기질 또는 발색성 합성 기질이 포함된다. 따라서, 특정 박테리아 균주에 대해 특이적인 효소 활성은 상기 기질들의 분열에 의해 검출된다. 검출의 특이성은 억제 시스템, 항생제 및/또는 항진균제의 혼합물을 배양 배지에 첨가함으로써 다른 미생물들의 성장을 제한하여 향상될 수 있다. 그러나, 억제제 혼합물은 표적 미생물과 동일한 속의 미생물의 성장을 제한하기 때문에 상기 표적 미생물들의 성장을 지연시키기도 한다.

[0007] 포스파티딜인노시톨-특이적 포스포리파제 C(하기에 PI-PLC: phosphatidylinositol-specific phospholipase C로

언급됨) 활성의 검출에 기초한, 발색성 또는 형광성 배지는 미국특허 6,284,517, 유럽특허 1 219 628 및 미국특허 6,558,917와 문헌 [Fricker et al., 2008](상술함)에 개시되었다. 상기 배지는 위음성, 특히 PI-PLC 활성을 나타내지 않는 *바실러스 세레우스* 그룹의 특정 균주(*B. 세레우스*, *B. 마이코이데스*, *B. 웨이헨스테판네시스*) 또는 약한 PI-PLC 활성을 나타내는 *바실러스 세레우스* 그룹의 특정 균주(*B. 안트라시스*)에서 위음성을 일으키거나, 또는 위양성을 일으키는 단점을 갖는다. 또한, 형광성 기질 4MU-MIP(4-메틸움벨리페릴 마이오이노시톨-1-포스페이트)는 미국특허 6,558,917에 나타난 정확한 pH 조건하에서, 반드시 사용해야 하는 가혹한 조건, 특히 형광이 단속적으로 측정되는 수성 배지에서 감소된 안정성을 나타낸다. 보다 정확하게, 배양을 산성 pH에서 수행하고, 그 후 배지를 염기성화하여 종말점에 관독되는 형광을 증가시키는 것이 필요하다. 미국특허 7,309,580는 PC-PLC용 발색성 기질 및 PI-PLC용 발색성 기질을 조합할 플레이팅 배지를 개시한다. 첫번째 기질 및 두번째 기질의 배지색은 각각 상이하고, 이는 효소 반응 생성물의 가능한 혼합에서 발생된 세번째 색과 또한 구별될 수 있다.

[0008] Biosynth® AG(스위스)에 의해 판매되는 BCM 배지는 PI-PLC용 발색성 기질 및 폴리믹신 B, 트리메토프림, 설파메톡사졸 및 시클로헥시미드를 포함하는 비-표적 박테리아군(bacterial flora)을 억제하기 위한 시스템을 사용한다. 시험이 수행되는 정도는 표준 배지에 비해 향상되지만, 일부 비정형 균주들은 거의 확인되지 않을 수 있다(상술한 문헌 [Fricker et al., 2008] 참조).

[0009] Oxoid™로 시판되는 Brilliance™ *바실러스 세레우스* 한천과 같은 β-글루코시다제 기질의 가수분해에 기초한 발색성 배지가 존재한다. 그러나, 폴리믹신 B 및 트리메토프림을 포함하는 항-그람-양성 억제 시스템의 존재에도 불구하고, 상기 기질은 그람-양성 위양성 뿐만 아니라 위음성도 유발한다(문헌 [Fricker et al., 2008]).

[0010] 마지막으로, PC-PLC용 발색성 기질의 가수분해에 기초한 발색성 플레이팅 배지: R&F® *안트라시스* 발색성 한천이 존재한다. 상기 기질은 24시간 내에 *바실러스 안트라시스*를 표시하는 음성 결과 및 48시간 내에 잠재적인 양성 결과를 나타낸다. 상기 결과를 획득하기 위한 시간은 길게 유지되고, 특이한 점은 수개의 항생물질들의 존재가 요구된다는 것이다.

[0011] 현재 그람-음성 박테리아의 억제제 및 PC-PLC용 형광성 기질을 포함하는 반응 배지를 이용한 *바실러스 세레우스* 그룹의 박테리아를 검출 및/또는 카운팅하기 위한 방법이 없다는 점이 상기 내용으로부터 나타나고, 상기 반응 배지에서는 6 내지 30 시간 내에 결과가 획득될 수 있다. 이러한 방법은 임상 진단 또는 산업 진단, 특히 식품-가공 산업에서 실제 부가가치를 갖는다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 상기에서 고려된 선행기술에 나타난 단점의 측면에서, 본 발명의 필수적인 목적은 하기와 같다:
- [0013] · 현존하는 시험보다 더 신속하게 양성 결과를 획득하기 위함이고;
- [0014] · 위양성의 수를 감소시키기 위함이고;
- [0015] · 감소된 억제 시스템의 사용을 통해, 민감성, 특히 샘플의 낮은 오염도에 대한 민감성을 향상시키기 위함이며;
- [0016] · 단일의 특이적 기질을 사용함으로써 매우 용이한 관독 및 해석을 제공하기 위함이고, 상기 관독은 자동화될 수도 있으며;
- [0017] · 특히 배지의 제조 및 기질의 안정성에 대해, 간소화된 반응 및/또는 배양 조건을 제공하기 위함이다.
- [0018] 첫번째 실시예에 따르면, 본 발명은 하기로 이루어진 단계를 포함하는 *바실러스 세레우스* 그룹의 박테리아를 확인하는 방법에 대한 것이다:
- [0019] · 반응용기 내에서, *바실러스 세레우스* 그룹의 박테리아를 함유할 수 있는 샘플, 하나 이상의 형광성 PC-PLC 기질을 포함하는 반응 배지 및 그람-음성 박테리아의 억제제를 접촉시키는 단계;
- [0020] · 상기 성분들 모두를 함께 배양하는 단계;
- [0021] · 상기 PC-PLC 기질 가수분해 반응을 검출함으로써 *바실러스 세레우스* 그룹의 박테리아를 확인하는 단계,
- [0022] 여기서, 상기 샘플 내에 잠재적으로 존재하는 *바실러스 세레우스* 그룹에 속하는 박테리아 이외의 다른 그람-양

성 박테리아에 의한 PC-PLC 기질의 가수분해가 검출될 수 있기 전에, *바실러스 세레우스* 그룹의 박테리아에 의한 상기 가수분해 반응이 검출되는 방식으로, 상기 반응 배지의 pH 및 상기 수행된 PC-PLC 기질 가수분해 반응을 검출하기 위해 필요한 시간이 조정된다.

- [0023] "기질 가수분해를 검출하기 위해 필요한 시간"이라는 표현은 샘플, 반응 배지 및 기질을 반응용기 내에서 접촉시키는 단계와 신호를 검출하는 단계 사이에 경과된 시간을 의미한다. 구체적으로, 상기 시간은 고정되고, 반응 시간으로 표현될 수 있다. 따라서, 상기 신호는 결과로서 고려될 수 있다. "샘플 내에 잠재적으로 존재하는 *바실러스 세레우스* 그룹에 속하는 박테리아 이외의 다른 그람-양성 박테리아에 의한 PC-PLC 기질의 가수분해가 검출될 수 있기 전에"라는 표현은, *바실러스 세레우스* 그룹의 박테리아의 부재시에, 상기 *바실러스 세레우스* 그룹의 박테리아의 검출 임계값에 대응하는 신호가 나타나기 전을 의미한다. 획득된 신호가 배경 노이즈와 유의적으로 다르지 않다면; 즉, 획득된 상기 신호가 검출 임계값을 초과하지 않는다면, 결과는 음성으로 여겨진다. 획득된 상기 신호가 배경 노이즈(background noise)와 유의적으로 다르다면, 상기 결과는 양성이다.
- [0024] 바람직하게는, 반응 배지의 pH는 6.8 내지 8.0이다.
- [0025] 바람직하게는, PC-PLC 기질 가수분해를 검출하기 위해 필요한 시간은 6 내지 30 시간이다.
- [0026] 본 발명에 따른 방법에서 이용된 반응 배지는 바람직하게는 고체, 액체 또는 겔 형태이다.
- [0027] 유리하게는, 본 발명에 따른 방법에서 이용된 반응 배지는 배양 배지일 수 있다.
- [0028] 유리하게는, 샘플 내에 존재하는 *바실러스 세레우스* 그룹의 박테리아의 카운팅이 또한 가능하다.
- [0029] 특정 일구현예에 따르면, 본 발명에 따른 방법은 마이크로플레이트, 마이크로웰, 마이크로튜브, 모세관 또는 멀티웰카드, 예컨대 본 출원인에 의해 개발되어 시판되는 VITEK® 또는 TEMPO® 카드에서 수행될 수 있다. 유리하게는, 본 발명에 따른 방법은 본 출원인에 의해 개발되고 시판되는 TEMPO®형 자동 미생물학적 시험 장치와 결합될 수 있다.
- [0030] 또다른 구현예에 따르면, 본 발명에 따른 상기 방법은 추가적으로 사전 전-증식 단계(prior pre-enrichment step)를 포함한다.
- [0031] 유리하게는, 본 발명에 따른 방법에 이용된 반응 배지는 두번째 기질인 하나 이상의 발색성 또는 형광성 기질을 추가적으로 포함한다. 특정 일구현예에 따르면, 상기 기질은 PI-PLC 기질이고, 이는 *바실러스 안트라시시스*를 *바실러스 세레우스* 및 *바실러스 투린지엔시스*와 구별할 수 있게 한다.
- [0032] 바람직하게는, 형광성 PC-PLC 기질은 4 MU-CP(4-메틸움벨리페릴 콜린 포스페이트)에 대응한다.
- [0033] 본 발명에 따른 방법의 특정 일구현예에 따르면, 상기 *바실러스 세레우스* 그룹의 박테리아는 *바실러스 세레우스*, *바실러스 안트라시시스*, *바실러스 투린지엔시스*, *바실러스 마이코이데스*, *바실러스 슈도마이코이데스* 및 *바실러스 웨이헨스테판네시스*로부터 선택되고, 상기의 다른 박테리아는 *리스테리아 모노사이토게네스*, *리스테리아 이바노비*, *스타필로코쿠스* 또는 *바실러스 spp.* 속의 다른 종, 예컨대 *바실러스 서브틸리스*, *바실러스 스파에리쿠스*, *바실러스 서큐란스*, *바실러스 렌투스*, *바실러스 푸밀리스*, *바실러스 메가테리움* 또는 *페니바실러스 폴리믹사*로부터 선택된다.
- [0034] 본 발명의 주제인 상기 방법은, 하나 이상의 그람-음성 박테리아의 억제제 및 PC-PLC에 대해 특이적인 형광성 기질을 함유하는 반응 배지를 포함하는 키트에 의하여 수행될 수 있다. 상기 배지는 분석대상인 분취량의 샘플과 함께 재현탁된다. 유리하게는, 본 발명에 따른 방법을 수행하기 위한 키트는 마이크로플레이트, 마이크로튜브, 마이크로웰, 모세관 또는 VITEK® 카드 또는 TEMPO® 카드와 같은 멀티웰카드 유형의 고체 반응용기를 또한 함유할 수 있다. 바람직하게는, 키트 내에서 사용되는 형광성 PC-PLC 기질은 4-메틸움벨리페릴 콜린 포스페이트(4 MU-CP)에 대응한다. 유리하게는, 본 발명에 따른 방법을 수행하기 위한 키트는 또한 하나 이상의 추가적인 발색성 기질 또는 형광성 기질을 포함한다. 바람직하게는, 상기 기질은 *바실러스 안트라시시스*를 *바실러스 세레우스*, *바실러스 투린지엔시스*, *바실러스 웨이헨스테판네시스*, *바실러스 마이코이데스* 및 *바실러스 슈도마이코이데스*와 구별할 수 있는 PI-PLC 기질이다.
- [0035] 시험의 특이성은 민감성과 선택성의 조합으로 결정된다. 시험 샘플 내에 종(species)이 적은 양으로 존재할 때, 민감성은 확인하려는 상기 종이 발견되는 정도로 정의된다. 낮은 민감성은 위음성 결과에 의해 나타날 것이다. 선택성은 다른 종이 추가적으로 함유되어 있는 샘플 내에서 확인하려는 종이 검출되는 정도로 정의된다. 발견되는 종의 대사를 위한 특정 기질의 사용은 선택성을 높인다. 그러나, 확인하려는 효소 활성을 거의 나타내지 않

는 균주가 검출되지 않을 수 있고, 이는 위음성 결과를 나타낼 수 있다. 유사하게, 억제제 혼합물의 사용, 즉 잠재적으로 존재하지만 검출되지 않기를 바라는 종의 성장을 둔화, 제한 또는 차단할 수 있는 화합물의 사용은 선택성을 향상시킨다. 매우 효율적이지 않은 억제제 시스템은 위양성 결과를 나타낼 수 있다.

[0036] "샘플"은 분석을 위한 독립체로부터 분리된 적은 부분 또는 적은 양을 의미한다. 샘플은 산업적 원료, 즉 비제한적인 목록에 따라, 공기 시편, 물 시편, 표면에서 획득된 시편, 제품의 부분 또는 식품 원료의 가공품일 수 있다. 비제한적인 방식에 따라, 식품 원료의 샘플 중에서 유제품(요거트, 치즈 등), 고기, 생선, 계란, 과일, 야채, 물 또는 음료(우유, 과일주스, 탄산음료 등)의 샘플이 언급될 수 있다. 또한 이러한 식품 원료의 샘플은 제조된 요리 또는 소스로부터 기원한 것일 수 있다. 마지막으로, 식품 샘플은 특히 동물 먹이와 같은 동물 사료로부터 유래될 수 있다. 샘플은 생물학적 기원, 즉 동물, 채소 또는 인간기원일 수 있다. 이어서, 샘플은 생물학적 유체(전혈, 혈청, 혈장, 소변, 수액, 유기 분비액), 조직 시편 또는 분리된 세포로부터 획득된 시편에 대응될 수 있다. 상기 시편은 당해 기술 분야에서 통상의 기술자에게 알려진 방법에 따라 시편이 분석될 때 또는 분석 전에, 농화, 추출, 농축 또는 정제 유형의 준비를 거치면서 사용될 수 있다.

[0037] 미생물학적인 테스트는 박테리아 또는 효모와 같이 잠재적으로 존재하는 미생물의 분리 및/또는 확인 및/또는 카운팅을 목적으로 하는 샘플의 분석에 대응한다. "반응 배지"라는 용어는 미생물의 생존 및/또는 성장에 필요한 모든 구성요소들을 포함하는 배지를 의미한다. 상기 반응 배지는 표현 배지(revealing medium)로서만 제공되거나 배양 및 표현 배지로서 제공될 수 있다. 첫번째 케이스에서는, 미생물들이 접종 전에 배양될 수 있고, 두번째 케이스에서는, 반응 배지가 또한 배양 배지를 구성한다. 반응 배지는 고체, 반고체 또는 액체일 수 있다. "고체"라는 용어는 예를 들어 겔화된 배지를 의미한다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 배지는 겔화된 배지이다. 미생물학에서 한천은 미생물들을 배양하기 위한 통상적인 겔화제이지만, 예를 들어 겔라이트, 젤라틴 또는 아가로스와 같은 다른 겔화제가 이용될 수 있다. 본 발명에 따른 반응 배지는 예를 들어 펩톤, 하나 이상의 성장 인자, 탄수화물, 하나 이상의 선택적 제제, 완충제, 하나 이상의 겔 화제 등과 같은 선택적 첨가제를 함유할 수 있다. 상기 반응 배지는 사용 준비가 된, 즉 튜브 또는 플라스크 또는 페트리 접시 상에서 접종할 준비가 된 액체 형태 또는 겔 형태일 수 있다.

[0038] 통상적으로, 반응 배지는 직접적 또는 간접적으로 검출가능한 신호에 의한 표적 미생물의 효소적 또는 대사적 활성을 검출하기 위한 기질을 추가적으로 함유할 수 있다. 직접적 검출에 대해서는, 상기 기질은 표지로서 작용하고, 이는 형광성 또는 발색성 부분에 연결될 수 있다. 간접적 검출에 대해서는, 본 발명에 따른 반응 배지는 기질의 소비에 의해 유도되고 표적 미생물의 성장을 나타내는 pH의 변화에 대해 민감한 pH 지시제(pH indicator)를 추가적으로 포함할 수 있다. 상기 pH 지시제는 발색물질 또는 형광물질일 수 있다. 발색물질의 예로서, 뉴트럴 레드(neutral red), 아닐린 블루(aniline blue) 및 브로모크레졸 블루(bromocresol blue)가 언급될 것이다. 형광물질에는, 예를 들어 4-메틸움벨리페론(4-methylumbelliferone), 히드록시쿠마린(hydroxycoumarin) 유도체 또는 레소루핀(resorufin) 유도체가 포함된다. 따라서, 본 발명에 따른 방법을 수행하기 위해 바람직하게 사용되는 형광성 PC-PLC 기질은 4-메틸움벨리페릴 콜린 포스페이트(4 MU-CP)에 대응한다.

도면의 간단한 설명

[0039] 본 발명에 따른 방법은 제한되지 않는 방식으로 하기의 실시예에 의해, 하기의 도면과 조합하여 더 잘 이해될 것이다:

- 도 1은 다양한 그람-양성 박테리아의 PC-PLC 활성의 속도론적 측정값을 도시한다.
- 도 2는 7.2 또는 6.8에 각각 고정된 배지의 pH에 대한 함수로서 *바실러스 세레우스* ATCC 7064 균주의 PC-PLC 활성의 속도론적 측정값을 도시한다.
- 도 3은 사용된 기질의 유형에 대한 함수로서 *바실러스 spp*의 다양한 균주에 대해 24시간 내에 획득된 발색 또는 형광의 강도를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040] 실시예 1: 다른 그람-양성 박테리아에 대해 관찰된 PC-PLC 활성과 *바실러스 세레우스*의 PC-PLC 활성의 비교 연구(도 1 및 표 1)

[0041] *바실러스* 속의 다양한 순 균주 뿐만 아니라 다른 그람-양성 박테리아도 하기 배지의 존재하에서 마이크로플레이트에서 시험되었다. 이어서, 37°C에서 44시간의 배양 기간에 걸쳐, 마이크로플레이트의 복수개의 각 웰에서 나

타나는 형광 발현은 각각 다른 시간에 관측된다.

1. 배지

pH 7.2에서, 하기의 조성을 갖는 배지가 이용되었다(조성의 단위는 g/l):

표 1

화합물	농도 g/l
효모 추출물	5
피루브산 나트륨	2
글리세로 인산마그네슘	1
염기성 HEPES 완충제	13.8
산성 HEPES 완충제	11.92
4-메틸움벨리페릴 콜린 포스페이트 ¹	0.4

¹ 4-메틸움벨리페릴 콜린 포스페이트(4 MU-PC), Biosynth® Ref. M-5528

2. 시험

마이크로플레이트의 웰은 *바실러스 세레우스* 그룹의 박테리아의 10개의 콜로니-형성 유닛(CFU: colony-forming unit) 및 다른 비-*세레우스 바실러스* 및 다른 그람-양성 박테리아에 대한 1000 CFU로 접종된다. 이어서, 상기 마이크로플레이트는 기질 4 MU-CP의 가수분해의 속도론적 형태로 상기 다양한 균주의 PC-PLC 활성을 평가하기 위하여, 즉 형광이 나타나는 것을 검출하고 측정하기 위하여, 마이크로플레이트 판독기(microplate reader)에서 37°C에서 44시간 동안 배양된다. 측정 기구의 검출 임계점은 30000 RFU(상대적인 형광 단위: relative fluorescence unit)로 고정된다.

3. 결과 및 해석

도 1은 *바실러스 세레우스*에서 관찰된 PC-PLC 활성(15시간 이후 양성 신호)과 다른 그람-양성 박테리아에서 관찰된 PC-PLC 활성(배양 40 시간 후에만 검출될 수 있는 양성 신호)의 유의적인 차이를 보여준다. 상기 결과를 얻기 위하여 배지에 복합 억제 시스템을 추가할 필요는 없다.

이러한 결과는 *바실러스 세레우스* 그룹에 속하는 10개의 균주와 *바실러스 세레우스* 그룹에 속하지 않는 15개의 다른 균주에 대해 비교 확인되었다. 후자의 결과는 표 2에 수집되어 있다.

따라서, 6 내지 30시간의 관독창(reading window)에서 *바실러스 세레우스* 그룹의 균주를 복합 억제제 혼합물이 없는 다른 그람-양성 박테리아(항-그람-음성 억제제만 존재함)와 비교하여 구별하는 것이 가능하다.

표 2

다양한 미생물에 의한 4 MU-PC의 가수분해에 의해 24 및 40시간에서 발생하는 형광값. 검출 임계점: 30 000 RFU. *바실러스 세레우스* 그룹에 속하는 박테리아는 굵게 표시된다.

박테리아의 종류	24시에서 형광값(RFU)	40시에서 형광값(RFU)
<i>바실러스 세레우스</i> ATCC 7064	> 60000	> 60000
<i>바실러스 세레우스</i> ATCC 6464	> 60000	> 60000
<i>바실러스 세레우스</i> ATCC 9139	> 60000	> 60000
<i>바실러스 세레우스</i> ATCC 10876	> 60000	> 60000
<i>바실러스 세레우스</i> ATCC 33019	> 60000	> 60000
<i>바실러스 세레우스</i> NCTC 11145	> 60000	> 60000
<i>바실러스 투린지엔시스</i> 0240015	> 60000	> 60000
<i>바실러스 마이코이데스</i> ATCC 6463	> 60000	> 60000
<i>바실러스 리체니포미스</i> 93.08.043	2000	2000
<i>바실러스 스파에리쿠스</i> 8710054	20000	> 60000
<i>바실러스 썬큐란스</i> ATCC 4513	10000	20000
<i>바실러스 서브틸리스</i> ATCC 6051	10000	20000
<i>바실러스 렌투스</i> ATCC 10840	5000	10000

바실러스 푸밀러스 ATCC 7061	5000	10000
페니바실러스 폴리막사 ATCC 21551	5000	10000
바실러스 메가테리움 ATCC 14581	5000	5000
L. 모노사이토게네스 ATCC 19118	4000	15000
L. 모노사이토게네스 0301902	5000	10000
L. 이바노비 ATCC 49954	2000	10000
L. 이바노비 0002147	2000	10000
S. 아우레우스 8407603	2000	2000
S. 아우레우스 25923	2000	2000
바세린	2000	2000

[0053] 실시예 2: pH 6.8와 pH 7.2에서의 바실러스 세레우스의 PC-PLC 활성 비교 연구(도 2)

[0054] pH 6.8(배지 B)와 비교하여 pH 7.2(배지 A)에서 바실러스 세레우스 ATCC 7064의 PC-PLC 활성의 동역학(dynamics)이 평가되었다.

[0055] 1. 배지

[0056] 배지 A는 pH 7.2에서 하기의 조성을 갖는다:

표 3

화합물	농도 g/l
효모 추출물	5
피루브산 나트륨	2
글리세로 인산마그네슘	1
염기성 HEPES 완충제	13.8
산성 HEPES 완충제	11.92
4-메틸움벨리페릴 콜린 포스페이트	0.4

[0058] 배지 B는 pH 6.8에서 하기의 조성을 갖는다:

표 4

화합물	농도 g/l
효모 추출물	5
피루브산 나트륨	2
글리세로 인산마그네슘	1
Na PIPES 완충제	16.22
DiNa PIPES 완충제	17.32
4-메틸움벨리페릴 콜린 포스페이트	0.4

[0060] 2. 시험

[0061] 10 CFU 바실러스 세레우스 ATCC 7064는 배지 A(pH 7.2) 및 배지 B(pH 6.8)의 존재하에서 마이크로플레이트의 웰 내로 접종되었다. 이어서, 마이크로플레이트는 연구된 두 개의 pH에서 바실러스 세레우스 ATCC 7064 균주의 PC-PLC 활성을 측정하기 위하여 마이크로플레이트 판독기 내에서 37°C에서 44 시간 동안 배양되었다.

[0062] 3. 결과 및 해석

[0063] 이에 따라, pH 7.2에서 획득된 바실러스 세레우스 ATCC 7064의 PC-PLC 활성 및 RFU 신호의 동역학은 더 크다. 실제로, 4 MU 형광 방출 강도는 배지의 pH에 따라 증가한다(방출에 대한 최적 pH = 10).

[0064] 바실러스 세레우스의 성장 및 PC-PLC 활성을 고려하면, 상기 배지의 최적 pH 는 7.2이다. 따라서, 더 큰 신호의 획득은 검출 시간을 감소, 즉 검출 임계점이 30 000 RFU인 특정 경우에는 10시간 정도가 감소될 수 있다.

[0065] NB: 바실러스 세레우스 그룹의 박테리아를 구별하기 위하여 4 MU-MIP(4-메틸움벨리페릴 마이오이노시톨-1-포스페이트, N-메틸모폴린 염, Biosynth® Ref. M-5717)을 사용하는 경우, 7.2의 상기 pH는 기질의 불안정성이 너무

커지기 때문에 사용될 수 없다. 따라서, 6.8의 pH가 필요하고, 이는 검출 시간을 증가시킨다.

[0066] 실시예 3: *바실러스 spp.*와 비교되는 *바실러스 세레우스* 그룹 박테리아의 PC-PLC 활성을 나타내기 위한 다양한 기질의 성능 수준(발색성과 형광성을 비교) 연구(도 3)

[0067] *바실러스* 속의 다양한 균주는 10개의 다른 배지에서 시험되었다. 이어서, 37°C에서 24시 및 48시 배양 후에 플레이트가 판독된다.

[0068] 시험된 기질은 발색성의 5-브로모-4-클로로-3-인독실콜린 포스페이트(X-CP), 발색성의 5-브로모-6-클로로-3-인독실콜린 포스페이트(마젠타-CP) 및 형광성의 4-메틸움벨리페론 콜린 포스페이트(4 MU-CP)이다.

[0069] 1. 배지

[0070] 하기의 조성을 갖는 배지가 사용되었다(조성의 단위는 g/l임):

[0071] - 효모 추출물: 5 g/l

[0072] - 글리세로 인산마그네슘: 1 g/l

[0073] - 한천: 13 g/l

[0074] - LiCl: 3 g/l

[0075] - MOPS: 12.6 g/l

[0076] - MOPS 나트륨염: 20.78 g/l

[0077] 상기 배지는 10개의 상이한 병(T, 1, ..., 9)으로 분배되었고, 그 후 15min/121°C 오토클레이브 사이클에 의해 살균되었다. 상기 배지 T는 성장 대조군으로서 제공된다. 삼투수에서 5-브로모-4-클로로-3-인독실콜린 포스페이트(X-CP), 5-브로모-6-클로로-3-인독실콜린 포스페이트(마젠타-CP) 및 4-메틸움벨리페론 콜린 포스페이트(4 MU-CP)의 저장 용액 30 g/l가 준비되었다. 이어서, 최종 X-CP의 100, 300 및 900 mg/l 농도에 대응하는 부피는 각각 1, 2 및 3으로 표시되는 용해된 배지에 각각 첨가되었다. 동일한 과정을 배지 4, 5 및 6과 각각 마젠타-CP 100, 300 및 900 mg/l와 4 MU-CP 100, 300 및 900 mg/l를 함유하는 배지 7, 8 및 9에 대해서도 반복하였다. 상기 한천 배지는 페트리 접시로 첨가되었다.

[0078] 2. 시험

[0079] 다양한 *바실러스* 균주가 0.5 McF(McFarland 단위)에서 서스펜션(suspension)을 이용하여 3/4 도말로 접종되었다. 이어서, 접시는 37°C에서 48시간 동안 배양되었다.

[0080] 형성된 콜로니는 24 및 48시간 배양 후에 시각적으로 관찰되었다. 이러한 콜로니의 착색 또는 형광(자외선 램프 366 nm에서 판독) 및 이의 강도가 표시되었다.

[0081] 3. 결과

[0082] 착색 강도 및 형광 강도는 0(착색/형광이 없음) 내지 4(착색/형광이 매우 강함) 범위에 이르는 상대적인 스케일로 판독된다.

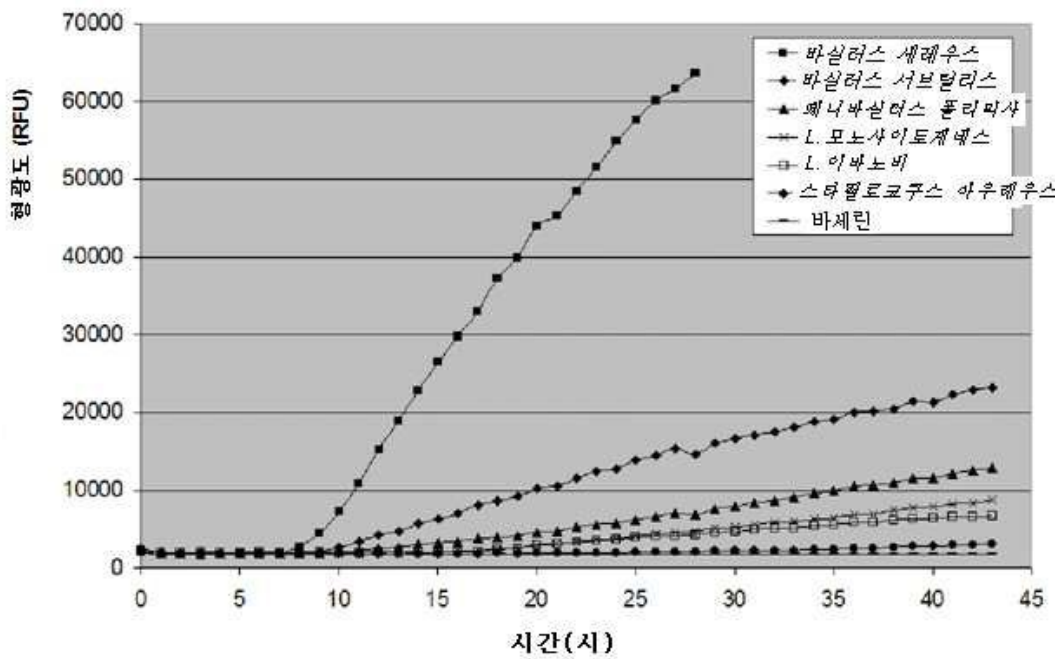
[0083] 상기의 결과는 도 3(다양한 *바실러스* 종을 24 시간 배양한 후 PC-PLC 활성의 표시)에 나타난다. 막대 표시의 부재는, 측정된 착색 또는 형광 강도가 배경 노이즈와 유의적으로 다르지 않다는 것을 나타내고, 이에 따라 음성 결과를 나타낸다.

[0084] 4. 해석

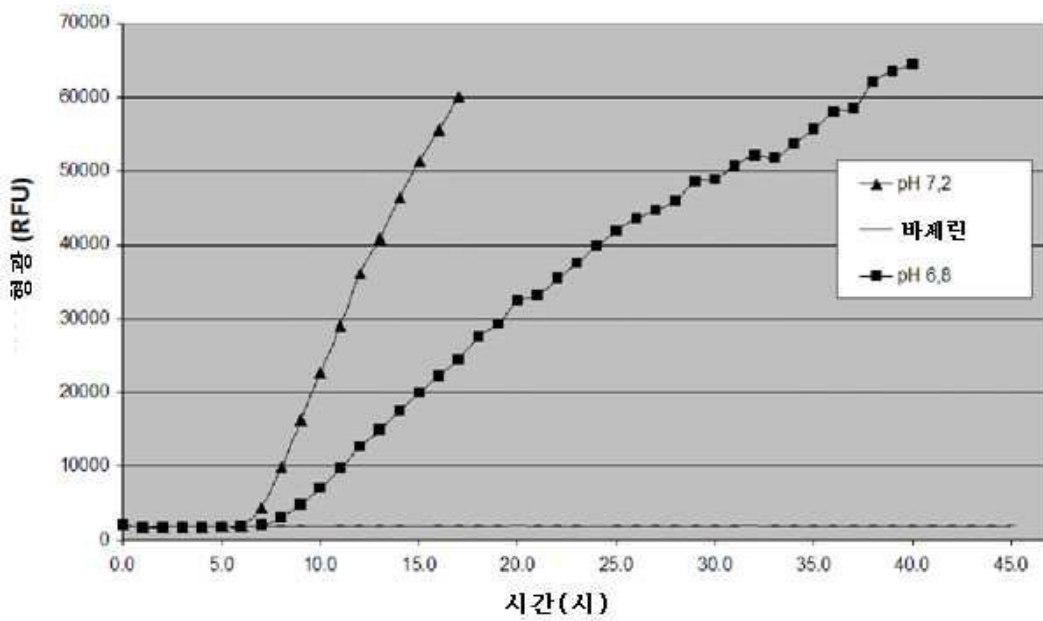
[0085] 형광성 PC-PLC 기질 4 MU-CP의 사용은, 발색성 기질(X-CP 및 마젠타-CP)과 달리, 특히 37°C에서 24시간 배양한 후에 시험된 모든 균주에 대해서, *바실러스 세레우스* 그룹의 박테리아를 높은 검출 민감성 및 특이성(100%)을 가진 *바실러스 서브틸리스*와 비교하여 검출하고 구별하게 할 수 있다.

도면

도면1



도면2



도면3

