



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년07월15일
(11) 등록번호 10-2000202
(24) 등록일자 2019년07월09일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/18 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C12Q 1/18 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2018-7017553</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2016년11월17일
심사청구일자 2018년07월19일</p> <p>(85) 번역문제출일자 2018년06월20일</p> <p>(65) 공개번호 10-2018-0085769</p> <p>(43) 공개일자 2018년07월27일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/EP2016/077918</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2017/085153
국제공개일자 2017년05월26일</p> <p>(30) 우선권주장
15195669.5 2015년11월20일
유럽특허청(EPO)(EP)
16152287.5 2016년01월21일
유럽특허청(EPO)(EP)</p> <p>(56) 선행기술조사문헌
KR101459577 B1*
KR1019970702374 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌</p> | <p>(73) 특허권자
센트리언트 파마슈티칼스 네덜란드 비.브이.
네덜란드 에이 엑스 델프트 2613 알렉산더 플레밍
란 1</p> <p>(72) 발명자
하네마이에르 레인더르트 마리누스
네덜란드 6100 에이에이 에흐트 피.오. 박스 4
야헤사르 드히레데이 한드러
네덜란드 6100 에이에이 에흐트 피.오. 박스 4</p> <p>(74) 대리인
리앤목특허법인</p> |
|--|--|

전체 청구항 수 : 총 12 항

심사관 : 김재현

(54) 발명의 명칭 폐기물 내의 항생제의 결정을 위한 검정

(57) 요약

본 발명은 폐기물, 예를 들어, 공장으로부터의 액체 또는 고체 폐기물 스트림 내의 항생제의 존재의 신속한 결정을 위한 간단하고 사용하기 용이한 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 폐기물 내의 항생제의 존재의 신속한 결정을 위한 검정 및 매뉴얼을 포함하는 키트에 관한 것이다.

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 락토스-부재 시료를 미생물, 켈화제 및 상기 미생물의 성장 또는 억제를 검출할 수 있는 지시약을 포함하는 검정 매질과 접촉시켜, 상기 락토스-부재 시료 및 상기 검정 매질의 어셈블리를 수득하는 단계;

(b) 단계 (a)에서 수득되는 상기 어셈블리를 항생제가 상기 락토스-부재 시료 중에 존재하지 않는 경우에 상기 미생물을 성장시키기에 충분한 기간 동안 인큐베이션시키는 단계; 및

(c) 상기 미생물의 성장 또는 성장의 억제를 상기 지시약으로 검출하는 단계를 포함하는, 본질적으로 락토스가 존재하지 않고/않거나 0.01%(w/w) 미만의 락토스를 함유하는 락토스-부재 시료 중에서 항생제의 존재 또는 부재의 결정 방법으로서,

단계 (a)에서 우유 및/또는 분유가 첨가되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 검정 매질이 영양소를 추가로 포함하는 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 지시약이 브로모크레솔 퍼플(Bromocresol Purple) 또는 브로모티몰 블루(Bromothymol Blue)인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 미생물이 호열성인 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 미생물이 바실러스 스테아로써모필러스(*Bacillus stearothermophilus*)인 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 켈화제가 한천인 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 단계 (a) 이전에 상기 락토스-부재 시료로부터 고체가 제거되는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 락토스-부재 시료 및 상기 첨가되는 우유 또는 분유 중 락토스의 양이 2 내지 5%(w/w)인 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

(i) 단계 (a)에서 알려져 있는 양의 항생제의 첨가, 또는

(ii) 단계 (a)에서 알려져 있는 양의 β -락탐 분해 화합물의 첨가, 또는

(iii) (i) 및 (ii)의 조합으로부터 선택되는 대조군 시험을 추가로 포함하는 방법.

청구항 10

(a) 우유의 첨가에 의해 소정의 회석 범위의 락토스-부재 시료를 제조하는 단계;

(b) 단계 (a)에서 수득된 각 회석액을 미생물, 영양소 및 상기 미생물의 성장 또는 억제를 검출할 수 있는 지시

약을 포함하는 검정 매질과 접촉시켜, 혼합물을 수득하는 단계;

(c) 단계 (b)에서 수득되는 각 혼합물을, 항생제가 상기 시료 중에 존재하지 않는 경우에 상기 미생물을 성장시키는 데 충분한 기간 동안 인큐베이션시키는 단계;

(d) 상기 미생물의 성장 또는 성장의 억제를 상기 지시약으로 검출하는 단계;

(e) 상기 미생물의 성장을 억제할 수 있는 가장 높은 희석률을 갖는 희석액을 결정하는 단계;

(f) 단계 (e)에서 결정된 희석액 중 항생제의 농도를 결정하는 단계, 및

(g) 단계 (f)에서 결정된 상기 농도와, 상기 희석액을 제조하기 위해 사용되는 단계 (e)에서 결정된 희석률을 곱함으로써 상기 락토스-부재 시료 중 항생제의 농도를 결정하는 단계를 포함하는, 본질적으로 락토스가 존재하지 않고/않거나 0.01%(w/w) 미만의 락토스를 함유하는 락토스-부재 시료 중 항생제의 농도의 결정 방법.

청구항 11

(a) 혼합물을 수득하기 위한, 미생물, 겔화제 및 상기 미생물의 성장 또는 억제를 검출할 수 있는 지시약을 포함하는 검정 매질이 있는 용기;

(b) 본질적으로 락토스가 존재하지 않고/않거나 0.01%(w/w) 미만의 락토스를 함유하는 락토스-부재 시료 중 항생제의 농도를 결정하기 위한 설명서를 포함하는 매뉴얼(manual); 및

(c) 분유를 포함하는 용기를 포함하는 키트.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

0.01% w/w 미만의 락토스를 함유하는 락토스-부재 시료, 미생물, 겔화제, 지시약, 및 우유 및 분유 중 하나를 포함하는 조성물로서, 락토스-부재 시료 중에서 항생제의 존재 또는 부재의 결정용 조성물.

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 폐기물, 예를 들어, 공장으로부터의 액체 또는 고체 폐기물 스트림 내의 항생제의 존재의 신속한 결정을 위한 간단하고 사용하기 용이한 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 폐기물 내의 항생제의 존재의 신속

[0001]

한 결정을 위한 검정 및 매뉴얼(manual)을 포함하는 키트에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 항미생물제 내성은 더 이상 미래에 대한 예측이 아니고, 세계의 모든 지역에서 지금 현재 일어나고 있고, 모든 나라의 모든 연령의 누구에게나 영향을 미칠 가능성을 갖는 주요한 세계적인 문제 중 하나이다. 항미생물제 내성(감염을 치료하기 위하여 항생제를 필요로 하는 사람들에서 항생제가 더 이상 작용하지 않도록 박테리아가 변하는 경우)은 이제 공중 보건에 큰 위협이 된다. 항미생물제 내성에 대한 국제 조약에 대한 제안을 포함하여, 이러한 위협에 대처하기 위한 세계적인 집단 조치에 대한 대중의 요구가 증가하고 있다. 항생제 내성은 전세계적으로 적절하게 맵핑되지 않았지만, 가장 영향을 많이 받은 국가는 보다 약한 건강관리 시스템을 가진 보다 가난한 국가이다. 항미생물제 내성을 발생시킬 수 있는 3가지 주요 방식이 존재한다: 특정 유형의 박테리아에 대한 천연적 내성, 유전적 돌연변이, 또는 또 다른 박테리아로부터 내성의 획득에 의한 방식.
- [0003] 항미생물제 내성은 미생물 자체의 돌연변이, 시간이 지남에 따른 내성의 축적 또는 항생제의 오용으로 인하여 자발적으로 일어날 수 있다. 내성 미생물은 치료하기 점점 어려워지고, 대체 약제 또는 더 높은 용량을 필요로 하며, 이들 둘 모두는 더 많은 비용이 들거나, 개체에게 더욱 독성일 수 있다. 일부 감염은 이미 항미생물제 내성으로 인해 치료 가능하지 않게 되고 있다.
- [0004] 항미생물제 내성은 매년 수백만건의 사망을 야기하는 점점 문제가 되는 주제이다. 약물 내성의 증가 경향은 4가지 주요 영역에 기인할 수 있다: 인간 집단에서의 항생제의 이용, 동물 집단에서의 항생제의 이용, 인간 및/또는 비-인간 공급원 간의 내성 균주의 확산, 및 항생제의 환경 방출.
- [0005] 항미생물제 내성에 대한 후자의 원인, 항생제의 환경 방출은 다양한 농업 및 산업 부분에서 증가하고 있는 문제이다. 이와 관련하여, 특히 "핫 스팟", 예를 들어, 병원 및 산업 폐수 및 처리되지 않은 도시 폐수를 통한 확산 및 환경의 오염은 증가하는 공중 보건 문제를 제시한다. 항생제는 몇몇의 공급원, 예를 들어, 인간 폐기물(약제, 농업), 동물의 치료 및 약제 산업을 통한 그들의 도입 후 환경을 오염시켜 왔다. 항생제 폐기물은 내성 박테리아를 함유하거나, 내성 박테리아의 발생을 위한 공급원일 수 있다. 결과적으로, 항생제 폐기물은 환경으로 항생제 내성 박테리아를 도입시킬 수 있다. 박테리아가 신속하게 복제함에 따라, 환경에 유입된 내성 박테리아는 분열을 계속하면서 그들의 내성 유전자를 복제한다. 또한, 내성 유전자를 지니는 박테리아(즉, 내성 박테리아)는 수평적 유전자 전달을 통해 그들 유전자를 다른 종으로 확산시키는 능력을 갖는다. 따라서, 특정 항생제가 더 이상 환경으로 도입되지 않더라도, 항생제-내성 유전자는 이후 지속적인 노출 없이 복제되는 박테리아를 통해 계속될 것이다.
- [0006] 결과 중 하나로서, 항생제의 생산자는 가장 깨끗하고, 가장 엄격하고, 지속 가능한 방법을 적용하여 생명을 구하는 약제의 생산의 환경 영향을 최소화하는 것을 보장해야 할 것이며, 이러한 관리의 첫 번째 단계는 (산업) 폐기물 스트림 내의 항생제 함량을 측정하는 것이다.
- [0007] 기술적으로, 이것은 최신 분석 방법을 사용하여 가능하다. 수성 스트림 내의 항생제의 양은 측광법, 전기화학, 기체 크로마토그래피 및 직접적 액체 크로마토그래피를 포함하는 몇몇의 방법의 수단에 의해 측정될 수 있다 (Pettas and Karayannis (2004), Anal. Chim. Acta 522, 275-280). 단점. 단점은 이들 기법이 힘들고, 시간이 소요되며, 종종 고가의 장치를 필요로 하며, 잘 훈련된 인력을 필요로 한다는 것이다. 결과적으로, 이들 방법은 높은 빈도로 및/또는 많은 위치에서 특히 높은 전문적 기술 없이 개인이 구현하는 것이 불가능하지 않더라도 어렵다.
- [0008] 따라서, 폐기물 스트림 내의 항생제의 존재 및/또는 농도를 결정하기 위한 간단하고, 저렴하며, 사용하기 용이한 방법이 필요하다. 본 발명은 이러한 방법을 제공한다.
- [0009] 항생제의 결정을 위한 미생물학적 검정은 다소 오랫동안 알려져 왔다. 이러한 검정의 예는 CA 2056581호, DE 3613794호, EP 0005891호, EP 0285792호, EP 2226389호, GB 1467439호, WO 94/18343호 및 WO 2005/118837호에 기재되어 있다. 대부분, 이들 검정은 낙농업에 사용하기 위해, 특히 우유의 분석을 위해 설계된다. 이들 미생물학적 검정은 미생물을 이용하고, 검정 매질에 첨가되는 지시약, 예를 들어, 지시약 신호를 제공할 수 있는 지시약 분자에 의해 나타난 변화에 의해 결과를 제공하는 즉시 사용 가능한 검정을 포함한다. 원리는 항생제가 미생물의 성장을 억제하기 위해 충분한 농도로 시료에 존재하는 경우, 지시약의 색상이 동일하게 유지되는 한편, 억제제가 발생하지 않는 경우, 미생물의 성장은 산의 형성 및/또는 감소된 대사산물 또는 지시약의 지시약 신호의 변화를 유도할 다른 현상을 동반한다는 것이다.

[0010] 불행히도, 이러한 검정이 우유보다 더 복잡한 기질, 예를 들어, 많은 다른 성분 또는 심지어 (반-)고체 폐기물, 예를 들어, 필터 케이크, 균사 또는 발효 과정으로부터의 농축된 잔류물을 포함하는 폐수 스트림에 적용되는 경우, 결과는 해석하기 어렵고, 결과적으로 신뢰 가능하지 않다. 지시약 변화가 지시약 분자의 색상의 변화이면, 이러한 변화는 종종 관찰하거나 해석하기 어렵다. 또 다른 가능한 단점은 복잡한 시료 내의 추가의 비-항미생물 성분이 검정 미생물의 적절한 기능에 영향을 미친다는 것이다.

발명의 내용

[0011] **요약**

[0012] 본 발명은

[0013] (a) 락토스-부재 시료를 미생물, 겔화제 및 미생물의 성장 또는 억제를 검출할 수 있는 지시약을 포함하는 검정 매질과 접촉시켜, 락토스-부재 시료 및 검정 매질의 어셈블리를 수득하는 단계;

[0014] (b) 단계 (a)에서 수득되는 어셈블리를 항생제가 상기 락토스-부재 시료에 존재하지 않는 경우에 상기 미생물을 성장시키기에 충분한 기간 동안 인큐베이션시키는 단계; 및

[0015] (c) 미생물의 성장 또는 성장의 억제를 지시약으로 검출하는 단계를 포함하며, 우유 및/또는 분유가 단계 (a)에서 첨가되는 것을 특징으로 하는, 본질적으로 락토스가 존재하지 않고/않거나 0.01%(w/w) 미만의 락토스를 함유하는 락토스-부재 시료 내의 항생제의 존재 또는 부재의 결정 방법에 관한 것이다.

[0016] 본 발명은 추가로

[0017] (a) 혼합물을 수득하기 위한 미생물, 겔화제 및 미생물의 성장 또는 억제를 검출할 수 있는 지시약을 포함하는 검정 매질이 있는 용기;

[0018] (b) 본질적으로 락토스가 존재하지 않고/않거나 0.01%(w/w) 미만의 락토스를 함유하는 락토스-부재 시료 내의 항생제의 농도를 결정하기 위한 설명서를 포함하는 매뉴얼을 포함하는 키트에 관한 것이다.

[0019] 본 발명은 추가로 본질적으로 락토스가 존재하지 않고/않거나 0.01%(w/w) 미만의 락토스를 함유하는 락토스-부재 시료 내의 항생제의 농도를 결정하기 위한 브로모크레솔 퍼플(Bromocresol Purple) 또는 브로모티몰 블루(Bromothymol Blue)의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 추가로, 본질적으로 락토스가 존재하지 않고/않거나 0.01%(w/w) 미만의 락토스를 함유하는 락토스-부재 시료 내의 항생제의 농도를 결정하기 위한 β -락탐 분해 화합물의 용도에 관한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 폐기물 내의 항생제를 결정하기 위한 간단하고, 저렴하며, 사용하기 용이한 방법을 제공하는 것이 본 발명의 목적이다. 또한, 복잡한 매트릭스, 예를 들어, 많은 다른 성분 또는 심지어 (반-)고체 폐기물, 예를 들어, 필터 케이크, 균사 또는 발효 과정으로부터의 농축된 잔류물을 포함하는 폐수 스트림을 포함하는 폐기물에 적용하기 위한 사용하기 용이한 미생물학적 검정 및 설명서를 포함하는 부품의 키트가 제공된다.

[0021] 본 발명은 독특하고, 신뢰성 있고, 간단한 다목적 시험 프로토콜을 제공한다.

[0022] 본 발명의 맥락에서, 용어 및 약어는 하기와 같이 정의된다.

[0023] 용어 "항생제"는 화합물, 예를 들어, β -락탐, 테트라사이클린, 아미노글리코시드, 퀴놀론 및 설폰아미드, 및 그들의 유도체; 및 그들의 임의의 조합을 지칭한다. 존재가 본 발명의 방법 또는 키트로 검출될 수 있는 항생제의 예에는 비제한적으로 아미노글리코시드(예를 들어, 아미카신(amikacin), 디베카신(dibekacin), 겐타마이신(gentamicin), 카나마이신(kanamycin) A, 네오마이신(neomycin) B, C 및 E, 네틸마이신(netilmicin), 시소마이신(sisomicin), 스트렙토마이신(streptomycin), 토브라마이신(tobramycin) 등), 세팔로스포린(ce/또는 재배열된 유도체가 포함되는 것이 중요하다.

[0024] 용어 "검정 매질"은 용액, 고체의 형태 또는 바람직하게는 졸 또는 겔과 같은 겔-유사 매트릭스의 형태의 조성물을 지칭한다. 검정 매질이 겔-유사 매트릭스의 형태를 갖는다면, 그것은 겔화제를 포함할 수 있다. 당업자는 고체 검정 매질이 운반 물질, 예를 들어, 세라믹, 먼, 유리, 금속 입자, 종이, 임의의 형상 또는 형태의 폴리머, 실리카이트, 스폰지, 울 등에 기반할 수 있음을 이해할 것이다. 통상, 검정 매질은 하나 이상의 지시약을 포함한다. 검정 매질은 검출제로서 하나 이상의 유형의 미생물 또는 효소 및 적어도 하나의 영양소를 포함할

수 있다. 검정 매질은 미생물, 지시약 및 영양소를 포함하는 정제, 디스크 또는 종이 필터의 형태를 가질 수 있다. 이들 3가지 구성성분은 단일의 정제뿐 아니라 2개 이상의 정제에 존재할 수 있다. 물론, 고체, 액체 및/또는 겔-유사 형태의 검정 매질을 조합한 검정도 또한 사용될 수 있다. 일 구현예에서, 미생물, 지시약 및 영양소는 한천 용액 내로 도입된다. 한천 용액이 고형화되게 하여, 검정 매질을 형성하여, 미생물이 계속 살아 있지만, 예를 들어, 예온 때문에 배가할 수 없게 한다. 일 구현예에서, 검정 매질 중 겔화제의 양은 2 내지 100 $\text{g} \cdot \ell^{-1}$, 바람직하게는 5 내지 50 $\text{g} \cdot \ell^{-1}$, 더욱 바람직하게는 10 내지 20 $\text{g} \cdot \ell^{-1}$, 가장 바람직하게는 12 내지 15 $\text{g} \cdot \ell^{-1}$ 이다. 바람직한 구현예에서, 겔화제는 한천이다. 선택적으로, 검정 매질은 또한, 하나 이상의 완충제, 안정화제, 계면활성제, 염, 긍정적인(감수성 개선) 또는 부정적인(감수성 감소) 방식으로 특정 항미생물 화합물에 대한 감수성을 변경시키는 물질, 점도 증가제 또는 그들의 임의의 조합을 함유할 수 있다. 완충제가 매질에 존재하는 경우, 그것은 매질의 구성성분의 혼합 동안 첨가되거나, 구성성분이 완충제 중에 용해 및/또는 현탁화될 수 있다. 적합한 완충화제는 알라닌, 인산칼륨 및 인산나트륨을 포함하나 이들에 한정되지 않는다. 특정 항미생물 화합물에 대한 감수성을 변경시키는 물질의 예에는 옥살산 또는 하이드로플루오르산의 설과 화합물 또는 염에 대한 미생물의 감수성을 개선시키는 오르메토프림(ormethoprim), 테트로소프림(tetroxoprim) 및 트리메토프림(trimethoprim)과 같은 항엽산제(antifolate) 또는 테트라사이클린에 대한 감수성을 개선시키는 칼슘 킬레이트화제가 있다. 시스테인 및 페니실린 결합 단백질은 특정 항미생물 화합물에 대한 감수성을 감소시키는 것으로 알려져 있는 화합물이다. 점도-증가제의 예에는 아스코르빌 메틸실란을 펙티네이트, 카보머, 카복시메틸 셀룰로스, 세타아틸 알코올, 세틸 알코올, 세틸 에스테르, 코카마이드 DEA, 유화 왁스, 글루코스, 하이드록시에틸 셀룰로스, 하이드록시프로필메틸 셀룰로스, 라우라아미드 DEA, 리놀레아미드 DEA, 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 말토덱스트린, PEG-8 디스테아레이트, 폴리아크릴아미드, 폴리비닐 알코올, PVP/헥사데센 코폴리머, 염화나트륨, 황산나트륨, 소이아미도프로필 베타인, 잔탄 고무 등이 포함되나 이들에 한정되지 않는다. 적합한 안정화제에는 예를 들어, 콜로이드성 실리카가 있다. 대안적으로, 상기 언급된 검정 매질의 선택적인 성분은 또한, 외인적으로 첨가될 수 있다. 검정 매질은 임의의 유형의 용기 내에 들어 있을 수 있으며; 빈번하게 사용되는 용기는 관, 마이크로타이터 플레이트 및 페트리 디쉬이다. 용기는 임의의 형상 및 크기의 것일 수 있으며, 지시약 변화의 관찰이 가능하다면, 이용 가능한 임의의 물질로부터의 것일 수 있다. 지시약 변화의 관찰은 시각적으로 수행될 수 있을 뿐 아니라 스캐너와 같은 시료-판독 디바이스를 사용하여 수행될 수도 있다. 선택적으로, 인큐베이션 동안 검정 매질이 채워진 상기 용기의 밀봉을 위한 수단 및/또는 사용 설명서가 있는 삽입물 및/또는 인큐베이션을 위해 필요한 시간을 설정하기 위한 수단이 검정 시스템의 일부이다. 선택적으로, 검정 매질은 멸균된다. 통상, pH는 필요한 값으로 조정된다. 본 발명의 방법은 시료를 (예를 들어, 다른 시료뿐 아니라, 예를 들어, 염, 완충 화합물, 안정화제, 동위원소-표지된 화합물, 형광-표지된 화합물 등과) 혼합하는 단계, 검정 매질로의 첨가 이전에 시료를 농축시키고/시키거나 (예를 들어, 희석액, 예를 들어, 물로) 추가로 희석시키는 단계를 포함할 수 있다.

[0025] 용어 "CFU"는 콜로니 형성 유닛의 약어이며, 미생물, 미생물의 포자, 부분적으로 발아된 미생물의 포자 및/또는 미생물의 콜로니를 생성할 수 있는 영양 세포의 수를 지칭한다. 상기 CFU의 농도는 검정 매질 ml 당 콜로니 형성 유닛($\text{CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$)으로 표현되며, 통상 1×10^5 내지 1×10^{12} $\text{CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$, 바람직하게는 1×10^6 내지 1×10^{10} $\text{CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$, 더욱 바람직하게는 2×10^6 내지 1×10^9 $\text{CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$, 가장 바람직하게는 5×10^6 내지 1×10^8 $\text{CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$ 또는 더더욱 바람직하게는 5×10^6 내지 2×10^7 $\text{CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$ 의 범위이다.

[0026] 용어 "겔화제"는 혼합물을 겔의 형태로 변경시키거나 겔의 형태를 취하는 것을 돕는 화합물 또는 물질을 지칭한다. 겔화제의 적합한 예에는 한천, 알긴산 및 그의 염, 카라기난, 젤라틴, 하이드록시프로필구아 및 그의 유도체, 로커스트 콩 검(캐롭 검(Carob gum)), 가공된 유케마 해초(eucheuma seaweed) 등이 있다.

[0027] 본 발명의 맥락에서, 용어 "지시약"은 특정 구성성분(예를 들어, 산, 염기, 산화 또는 환원제)의 존재에 관한 검정 매질의 조건을 (예를 들어, 색상 또는 형광의 변화에 의해) 측정하기 위해 사용되는 물질을 지칭한다. 지시약은 하나의 상태에서 다른 상태로의 변경 시에, 검출 가능한 신호, 예를 들어, 색상 또는 형광의 변화를 제공한다. 지시약은 pH-지시약, 산화환원-지시약 또는 그들의 조합일 수 있다. 본원에서 용어 지시약은 또한, 둘 이상의 지시약을 지칭할 수 있다. 적합한 지시약의 예는 숙련자에게 널리 알려져 있다(문헌[handbook H.J. Conn's Biological Stains, R.D. Lillie ed., Baltimore, 1969] 참조). 하나의 상태에서 다른 상태로의 변경 시에, 가시적으로 검출 가능한 신호, 예를 들어, 색상 또는 형광의 변화를 제공하는 지시약이 특히 유용하다. 검정 매질 중 지시약의 양은 0.01 내지 50 $\text{g} \cdot \ell^{-1}$ 검정 매질, 바람직하게는 0.1 내지 10 $\text{g} \cdot \ell^{-1}$, 더욱 바람직하

계는 0.5 내지 5 g.ℓ⁻¹, 가장 바람직하게는 1 내지 3 g.ℓ⁻¹이다. 이러한 지시약은 문헌['H.J. Conn's Biological Stains', R.D. Lillie ed., Baltimore, 1969]과 같은 편람으로부터 용이하게 선택될 수 있다. 바람직한 지시약은 pH-지시약 및/또는 산화환원 지시약이다. 적합한 지시약의 예에는 애시드 블루(Acid Blue) 120, 애시드 오렌지(Acid Orange) 51, 애시드 옐로우(Acid Yellow) 38, 알리자린 애시드(Alizarin acid), 알리자린 블루(Alizarin Blue), 아주르(Azure) A, 아주르 B, 베이직 블루(Basic Blue) 3, 브릴리언트 블랙(Brilliant Black), 브릴리언트 크레실 블루(Brilliant Cresyl Blue), 브릴리언트 크로세인(Brilliant Crocein) M00, 브릴리언트 옐로우(Brilliant Yellow), 브로모크레솔 그린(Bromocresol Green), 브로모크레솔 퍼플(Bromocresol Purple), 브로모페놀 블루(Bromophenol Blue), 브로모페놀 레드(Bromophenol Red), 브로모티몰 블루(Bromothymol Blue), 클로로크레솔 그린(Chlorocresol Green), 콩고 레드(Congo Red), 엠-크레솔 퍼플(m-Cresol Purple), 갈로시아닌(Gallocyanine), 인디고 카르민(Indigo Carmine), 야누스 그린(Janus Green) B, 리트머스(Litmus), 메틸렌 블루(Methylene Blue), 메틸 레드(Methyl Red), 나일 블루(Nile Blue) A, 니트라졸 옐로우(Nitrazol Yellow)(니트라진 옐로우(Nitrazine Yellow)로도 지칭됨), o-니트로페놀(o-Nitrophenol), p-니트로페놀, 1-10 페난트롤린(Phenanthroline), 페놀프탈레인(Phenolphthalein), 페놀 레드(Phenol Red), 사프란닌(Safranin) O, 티오닌(Thionin), 티몰 블루(Thymol Blue), 톨루이딘 블루(Toluidine Blue) 및 자일레놀 블루(Xylenol Blue)가 있다. 바람직한 지시약은 4.5 내지 8.0, 바람직하게는 5.0 내지 7.5, 더욱 바람직하게는 5.5 내지 7.0의 pH 범위에서 색상을 변경시키는 지시약이며, 바람직하게는 이들은 브로모크레솔 그린, 브로모크레솔 퍼플, 브로모티몰 블루, 메틸 레드 또는 페놀 레드, 가장 바람직하게는 브로모크레솔 퍼플 또는 브로모티몰 블루이다.

[0028] 용어 "락토스-부재 시료"는 우유 또는 다른 락토스-포함 유제품이 아닌 시료를 지칭한다. 락토스-부재 시료는 항생제의 존재 또는 부재를 결정할 필요가 있으며, 종래 기술 항생제 검정이 광범위하게 적용 가능하고 인식되는 우유의 시료와 차별화될 시료를 지칭한다. 락토스-부재는 또한 본질적인 락토스-부재를 포함한다. 전형적으로, 락토스-부재 시료는 0.01%(w/w) 미만의 락토스, 예를 들어, 0.0001%(w/w) 내지 0.01%(w/w)의 락토스, 바람직하게는 0.00001%(w/w) 내지 0.005%(w/w)의 락토스를 함유한다. 락토스-함량은 숙련자에게 알려져 있는 방법에 따라 결정될 수 있다. 바람직하게는, 락토스-함량은 ISO 22662:2007에 따라 결정된다. 본 발명의 맥락에서 락토스-부재 시료의 예에는 수성 및 고체 폐기물 스트림 둘 모두를 포함하는 공장으로부터의 산업 폐기물 스트림으로부터의 시료, 폐수 및 지표수, 예를 들어, 강, 호수, 개울 등으로부터의 시료, 및 가축 소변 또는 거름으로부터의 시료가 포함된다. 본 발명에 사용하기 위한 락토스-부재 시료는 물, 폐수, 공정 용수, 오수, 식수, 예를 들어, 수영장, 사우나 및 온실에 적용되는 물, 및 냉각수와 같은 유체로부터의 것일 수 있다. 그것은 농업 공급원(agricultural source), 양식장, 선박 밸러스트, 냉각탑, 폐수 처리 공장, 발전소, 화학약품 산업, 예를 들어, 직물 산업, 종이 및 펄프 산업, 인쇄 산업, 철강 산업, 코크스 산업, 석유 산업, 농약 산업, 페인트 산업, 의료 및 치과 산업, 용제 산업, 약제 산업, 목재 보존 화학 산업, 및 식품 산업으로부터의 물일 수 있다. 유체는 상기 공급원 중 임의의 것으로부터의 유입 폐수 및/또는 스트림, 유출 폐수 및/또는 스트림, 또는 중간 폐수 및/또는 스트림일 수 있다.

[0029] 용어 "미생물"은 항생제에 대해 감수성이며, 항생제의 존재 또는 부재가 그의 성장에 의해 결정되는 미생물을 지칭한다.

[0030] 본원에 사용되는 용어 "영양소"는 미생물의 성장을 촉진시키고/시키거나 이에 필요한 영양 물질 또는 성분을 지칭한다. 적합한 영양소는 검정 매질에 사용되는 미생물에 따라 달라진다. 검정 매질은 둘 이상의 상이한 영양소를 포함할 수 있다. 그들은 동화 탄소원, 예를 들어, 탄수화물, 예를 들어, 글루코스, 프룩토스, 수크로스, 락토스 및 텍스트로스; 동화 질소원, 예를 들어, 아미노산, 예를 들어, 펩톤 또는 트립톤; 비타민 및 성장 인자 공급원, 예를 들어, 소고기 또는 효모 추출물; 및 미네랄 공급원, 예를 들어, 알칼리 토금속염, 예를 들어, 바륨 또는 칼슘의 염을 포함하나 이들에 한정되지 않는다.

[0031] 용어 "분유" 또는 "건조 우유"는 우유를 건조될 때까지 증발시킴으로써 제조되는 제작된 유제품을 지칭한다. 우유 건조의 하나의 목적은 그것을 보존하기 위한 것이며; 분유는 액상유보다 훨씬 더 긴 보관 수명을 가지며, 그의 낮은 함수량으로 인하여 냉장시킬 필요가 없다. 또 다른 목적은 수송의 경제성을 위해 그의 부피를 감소시키기 위한 것이다. 분유 및 유제품은 전지분유, 무지방(탈지) 분유, 건조 버터밀크, 건조 유청 제품 및 건조 낙농 블렌드와 같은 물품을 포함한다.

[0032] 본 발명의 맥락에서, 용어 "포자"는 미생물에 의해 생성되고, 새로운 개별 미생물로 발생할 수 있는 통상적으로 원시 단세포이며, 종종 환경적으로 저항성인 휴면 또는 생식체를 지칭한다.

- [0033] 제1 양태에서, 본 발명은
- [0034] (a) 락토스-부재 시료를 미생물, 젖화제 및 미생물의 성장 또는 억제를 검출할 수 있는 지시약을 포함하는 검정 매질과 접촉시켜, 락토스-부재 시료 및 검정 매질의 어셈블리를 수득하는 단계;
- [0035] (b) 단계 (a)에서 수득되는 어셈블리를 항생제가 상기 락토스-부재 시료에 존재하지 않는 경우에 미생물을 성장 시키기에 충분한 기간 동안 인큐베이션시키는 단계; 및
- [0036] (c) 미생물의 성장 또는 성장의 억제를 지시약으로 검출하는 단계를 포함하며, 우유 및/또는 분유가 단계 (a)에서 첨가되는 것을 특징으로 하는, 본질적으로 락토스가 존재하지 않고/않거나 0.01%(w/w) 미만의 락토스를 함유하는 락토스-부재 시료 중 항생제의 존재 또는 부재의 결정 방법에 관한 것이다.
- [0037] 놀랍게도, 항생제의 존재 또는 부재에 대하여 시험할 락토스-부재 시료로의 우유 또는 분유의 첨가가, 우유(분유)의 부재 하에 유사한 검정을 수행하는 것에 비하여, 정확성 및 검출의 용이성의 개선을 야기하는 것이 관찰되었다. 우유 중 항생제의 결정을 위하여 미생물학적 검정을 수행하는 것은 본 발명의 배경기술에 기재된 바와 같이 잘 알려져 있다. 낙농업으로부터 기인하지 않는 시료 중 항생제의 결정을 위하여 미생물학 검정을 사용하는 것도 또한 보고되어 있으며; 통상 이들은 수성 락토스-부재 유체이다. 그러나, 우유(분유)를 상기 락토스-부재 시료에 첨가함으로써 락토스-부재 시료 중 항생제의 결정을 개선시키는 것은 커녕 이를 수행하는 것도 종래 기술에서 제안되지 않았다. 이러한 관찰의 메커니즘은 아직 완전히 이해되지 않는다. 그것이 검정 매질에서의 우유의 영향, 미생물(의 성장), 지시약에 대한 착색 효과 또는 분석할 락토스-부재 시료와의 화학적 또는 물리적 상호작용과 관련되는지 여부는 종래 기술에서 현재 추측에 근거하며, 뒷받침되지 않는다.
- [0038] 제1 구현예에서, 미생물은 바실러스(*Bacillus*), 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) 또는 스트렙토코커스(*Streptococcus*)의 균주이다. 추가의 구현예에서, 미생물은 호열성 미생물, 예를 들어, 바실러스 스테아로써모필러스(*Bacillus stearothermophilus*) 또는 스트렙토코커스 써모필러스(*Streptococcus thermophilus*)이다. 검정 매질은 검출제로서 하나 이상의 유형의 미생물을 포함할 수 있다. 미생물은 콜로니를 생성할 수 있는 유닛 또는 CFU로서 검정 매질에 도입될 수 있다. 인큐베이션 단계 (b)에서 미생물의 성장은 소정의 기간 동안, 바람직하게는 0.5 내지 4시간, 더욱 바람직하게는 1 내지 3.5시간, 가장 바람직하게는 2.0 내지 3.25시간의 기간 내에 일어나는 것이다. 바람직하게는, 미생물의 성장은 소정의 온도, 바람직하게는 미생물의 최적의 성장 온도에서 행해진다. 예를 들어, 호열성 미생물이 사용되는 경우, 상기 온도는 바람직하게는 40 내지 70℃, 더욱 바람직하게는 50 내지 65℃, 가장 바람직하게는 60 내지 64℃이다. 선택적으로, 상기 반응은 항온 디바이스를 사용하여 수행될 수 있다. 항온 디바이스를 사용하여, 시료는 사전 설정된 온도, 예를 들어, 미생물이 충분한 성장을 보여주는 온도로 유지될 수 있다. 바람직하게는, 상기 항온 디바이스는 그것이 검정 매질로 채워진 용기를 유지할 수 있는 방식으로 설계된다. 선택적으로, 항온 디바이스는 인큐베이션에 필요한 시간을 설정하기 위한 수단에 커플링되어, 사전 설정된 기간의 경과 후에 가열 및/또는 냉각이 중단되게 한다. 대안적으로, 미생물의 성장에 필요한 시간은 임의의 소독제 없이 보정 시료가 지시약의 변화를 유도하는 데 필요한 시간과 같다.
- [0039] 제2 구현예에서, 고체는 단계 (a) 이전에 상기 락토스-부재 시료로부터 제거된다. 이러한 제거는 숙련자가 이용 가능한 작업, 예를 들어, 원심분리, 경사분리, 여과 등을 사용하여 시행될 수 있다. 선택적으로, 상기 락토스-부재 시료가 많은 고체를 함유하거나 심지어 고체인 경우, 시료를 유리하게는 고체의 제거 이전에 먼저 수용액과 혼합한다. 상기 수용액은 우유 또는 물과 혼합된 분유일 수 있다.
- [0040] 제3 구현예에서, 조합된 락토스-부재 시료 + 첨가되는 우유 또는 분유에 존재하는 락토스의 양은 1 내지 10%(w/w), 바람직하게는 2 내지 5%(w/w)이다.
- [0041] 제4 구현예에서, 알려져 있는 양의 항생제가 단계 (a)에서 첨가되는 대조군 시험이 수행된다. 상기 항생제는 임의의 항생제일 수 있으며, 바람직하게는 페니실린 G K이다.
- [0042] 제5 구현예에서, 알려져 있는 양의 β-락탐 분해 화합물이 단계 (a)에서 첨가되는 대조군 시험이 수행된다. 상기 β-락탐 분해 화합물은 임의의 β-락탐 분해 화합물일 수 있으며, 바람직하게는 β-락타마제이다.
- [0043] 대조군 시험이 본 발명의 방법의 적절한 기능을 위해 의무적인 것은 아니지만, 숙련자는 제4 및 제5 구현예의 대조군 시험 둘 모두가 제1 양태의 방법과 함께 수행되는 경우에 결과의 신뢰성이 개선되는 것을 이해한다.
- [0044] 제6 구현예에서, 본 발명은
- [0045] (a) 우유의 첨가에 의해 소정의 희석 범위의 락토스-부재 시료를 제조하는 단계;

- [0046] (b) 단계 (a)에서 수득된 각각의 희석액을 미생물, 영양소 및 지시약을 포함하는 검정 매질과 접촉시키는 단계;
- [0047] (c) 단계 (b)에서 수득된 각각의 혼합물을 항생제가 시료에 존재하지 않는 경우에 미생물을 성장시키기 위한 기간 동안 인큐베이션시키는 단계;
- [0048] (d) 미생물의 성장 또는 성장의 억제를 지시약으로 검출하는 단계;
- [0049] (e) 미생물의 성장을 억제할 수 있는 가장 높은 희석률을 갖는 희석액을 결정하는 단계;
- [0050] (f) 단계 (e)에서 결정된 희석액 중 항생제의 농도를 결정하는 단계, 및
- [0051] (g) 단계 (f)에서 결정된 농도를 희석액을 제조하기 위하여 사용되는 단계 (e)에서 결정된 희석률과 곱하여, 상기 락토스-부재 시료 중 항생제의 농도를 결정하는 단계를 포함하는, 락토스-부재 시료 중 항생제의 농도의 결정 방법을 제공한다.
- [0052] 미생물의 성장 또는 성장의 억제는 지시약의 변화의 존재 또는 부재를 관찰함으로써 검출된다. 바람직하게는, 이것은 희석 범위의 각 희석액에 대하여 행해진다. 예를 들어, 지시약의 변화가 색상 변화인 경우, 색상 변화는 가시적으로 관찰될 수 있다. 그러나, 본 발명의 일 구현예에서, 색상 변화는 디지털 이미지 데이터를 생성하는 장치 또는 아날로그 이미지 데이터를 생성하며 상기 아날로그 이미지 데이터를 디지털 이미지 데이터로 전환한 다음 컴퓨터 프로세서에 의해 상기 디지털 이미지 데이터를 해석하는 장치를 사용하여 결정된다. 예를 들어, 시료-판독 디바이스, 예를 들어, 개인 컴퓨터에 연결된 스캐너일 수 있는 이러한 장치는 WO 03/033728호에 기재되어 있다. 이러한 장치로, 시험 플레이트에서 시료 각각의 하층을 스캐닝할 수 있다. 반사된 광의 색상 및 밝기는, 각각 하나의 색상 구성요소를 나타내는 3가지 변수, 예를 들어, 소위 $L^*a^*b^*$ 모델로 등록된다. $L^*a^*b^*$ 모델에서, 색상 스펙트럼은 2-차원 매트릭스에서 나뉜다. 이러한 매트릭스에서 색상의 위치는 2개의 변수 "a" 및 "b"에 의해 등록된다. 변수 L은 강도를 나타낸다(예를 들어, 연청색에서 진청색까지). a-값, b-값 및 L-값을 포함하는 기준을 만들어, 하기와 같은 복합 함수를 만들 수 있다:
- [0053]
$$Z = w_L \cdot L + w_a \cdot a + w_b \cdot b$$
- [0054] 여기서, w_L , w_a 및 w_b 는 각각 L-값, a-값 및 b-값에 대한 가중 계수이다. 이들 가중 계수의 값은 그룹 평균이 확산과 관련된 최대 거리를 보여주도록 "판별 분석"에 의해 계산될 수 있다. 소독제 및 시료의 유형에 좌우되는 사전결정된 방식으로 $L^*a^*b^*$ 모델에서 색상 구성요소 중 둘 이상을 조합함으로써, 정확한 검출이 가능하다. 실제로, 검정이 양성결과 음성 결과 간에 전환되어야 하는 Z의 특정 값은 각 소독제에 대하여 실험으로 사전 결정된다. 요망된다면, 상기 기재된 판독 및 컴퓨터 장비는 가열 장비, 예를 들어, WO 2007/090683호에 기재된 바와 같은 항온 디바이스와 조합될 수 있다.
- [0055] 본 발명의 제2 양태에서, 본 발명의 제1 양태의 방법을 수행하기 위한 키트가 제공되며, 상기 키트는 (a) 혼합물을 수득하기 위한 미생물, 결핵제 및 미생물의 성장 또는 억제를 검출할 수 있는 지시약을 포함하는 검정 매질이 있는 용기, 및 (b) 본 발명의 제1 양태의 방법을 수행하기 위한 매뉴얼, 예를 들어, 본질적으로 락토스가 존재하지 않고/않거나 0.01%(w/w) 미만의 락토스를 함유하는 락토스-부재 시료 중 항생제의 농도를 결정하기 위한 설명서를 포함하는 매뉴얼을 포함한다. 이러한 키트는 상기 기재된 바와 같은 검정 매질을 포함하는 하나 이상의 용기를 포함한다. 용기는 지시약 변화의 관찰이 가능하다면, 임의의 형상 및 크기, 그리고 이용 가능한 임의의 물질로부터의 시험관일 수 있다. 또한, 용기는 마이크로-타이터 플레이트에 혼입되는 것들과 같은 웰(well)일 수 있다.
- [0056] 본 발명의 제1 양태의 방법을 수행하기 위한 매뉴얼은 적어도 여과 또는 원심분리에 의한 고체의 임의의 제거 및 본 발명의 제1 양태에 기재된 바와 같은 우유 또는 분유의 첨가를 포함하는 시료 처리를 위한 설명서를 포함할 것이다.
- [0057] 제1 구현예에서, 키트는 분유를 포함하는 하나 이상의 용기를 포함한다.
- [0058] 제2 구현예에서, 키트는 유체가 상기 검정 매질에 첨가될 수 있는 디바이스인 시료추출 디바이스를 포함한다. 바람직하게는, 이러한 디바이스는 임의로 용량 표시가 있는 용기이다. 더욱 바람직하게는, 이러한 디바이스는 주사기, 피펫 또는 자동화 피펫팅 시스템이다. 이러한 주사기 또는 피펫은 오직 한가지 모드의 작동으로 사전결정된 부피가 분석할 유체로부터 유출될 수 있는 방식으로 설계될 수 있다. 선택적으로, 하나 초과와 주사기 또는 피펫이 단일의 취급으로 작동될 수 있게 하는 해당 분야에 알려져 있는 시스템이 적용될 수 있다. 본 발명의 제1 양태에 따라 첨가될 유체의 양의 단순한 첨가를 가능하게 하는 키트를 제공하는 것이 본 발명의 제2 양태의

목적이다.

- [0059] 제3 구현예에서, 키트는 인큐베이션 동안 검정 매질을 포함하는 상기 용기를 밀봉하기 위한 수단을 포함한다.
- [0060] 제4 구현예에서, 키트는 대조군 시험을 수행하기 위해 사용될 알려져 있는 양의 항생제가 있는 하나 이상의 용기를 포함한다. 상기 항생제는 임의의 항생제일 수 있으며, 바람직하게는 페니실린 G K이다.
- [0061] 제5 구현예에서, 키트는 대조군 시험을 수행하기 위해 사용될 알려져 있는 양의 β -락탐 분해 화합물을 갖는 하나 이상의 용기를 포함한다. 상기 β -락탐 분해 화합물은 임의의 β -락탐 분해 화합물일 수 있으며, 바람직하게는 β -락타마제이다.
- [0062] 본 발명의 제2 양태의 제6 구현예에서, 키트는 항온 디바이스를 포함하며, 이를 사용하여, 시료를 사전-설정된 온도, 예를 들어, 미생물이 충분한 성장을 보이는 온도로 유지할 수 있다. 바람직하게는, 상기 항온 디바이스는 그것이 검정 매질로 채워진 상기 용기를 보유할 수 있는 방식으로 설계된다. 선택적으로, 항온 디바이스는 인큐베이션에 필요한 시간을 설정하기 위한 수단에 결합되어, 가열 및/또는 냉각이 사전-설정된 기간의 경과 후에 중단되게 한다.
- [0063] 제7 구현예에서, 키트는 시료-판독 디바이스로부터 획득되는 디지털 데이터를 컴퓨터가 분석하도록 지시하기에 적합한 컴퓨터 프로그램이 로딩된 데이터 캐리어를 포함한다. 상기 데이터 캐리어는 디지털 정보를 저장하기에 적합한 임의의 캐리어, 예를 들어, CD-ROM, 디스켓, DVD, 메모리 스틱, 자기 테이프 등일 수 있다. 유리하게는, 컴퓨터 프로그램이 로딩된 상기 데이터 캐리어는 본 발명의 방법에 사용하기에 적합한 최신의 이용 가능한 컴퓨터 프로그램으로의 용이한 접근을 제공한다.
- [0064] 본 발명의 제3 양태에서, 0.01% w/w 미만의 락토스를 함유하는 락토스-부재 시료, 미생물, 겔화제, 지시약 및 우유 및 분유 중 하나를 포함하는 조성물이 제공된다. 이러한 조성물은 본 발명의 제1 양태의 방법이 락토스-부재 시료, 예를 들어, 수성 및 고체 폐기물 스트림 둘 모두를 포함하는 공장으로부터의 산업 폐기물 스트림으로부터의 시료, 폐수 및 지표수, 예를 들어, 강, 호수, 개울 등으로부터의 시료, 및 가축 소변 또는 거름으로부터의 시료에 적용되는 경우의 결과이다.
- [0065] 본 발명의 제4 양태에서, 본질적으로 락토스가 존재하지 않고/않거나 0.01%(w/w) 미만의 락토스를 함유하는 락토스-부재 시료 중 항생제의 농도를 결정하기 위한 브로모크레솔 퍼플 또는 브로모티몰 블루 또는 β -락탐 분해 화합물의 용도가 제공된다.
- [0066] **실시예**
- [0067] **실시예 1**
- [0068] **폐수 중 항생제의 결정을 위한 매뉴얼**
- [0069] 하기는 본 발명의 키트에 매뉴얼로서 포함될 수 있는 것에 대한 비-제한적인 예이다.
- [0070] 환경:
- [0071] 항생제 결정이 실행될 환경에 β -락탐이 존재하지 않음을 확인한다. 실내에서 상기의 것을 보장할 수 없다면, 대안으로서 층류 캐비닛이 사용될 수 있다.
- [0072] 장비/부속품:
- [0073] - 2 ml의 원심분리 튜브용 원심분리기(회전 속도 15,000 rpm)
- [0074] - 37°C 및 65°C의 온도로 설정될 수 있는 수조
- [0075] - pH 측정기
- [0076] - 시료를 보관하기 위한 개별 구획이 있는 동결기; 동결기 내의 밀폐 상자가 대안으로 사용될 수 있음
- [0077] - 10 내지 100 μ l 및 100 내지 1000 μ l의 에펜도르프(Eppendorf) 피펫
- [0078] - 100 μ l 및 1000 μ l의 에펜도르프 피펫 포인트
- [0079] - 2.0 ml의 원심분리 튜브
- [0080] - 스크루 캡이 있는 10 ml의 원심분리 튜브

- [0081] - 스크류 캡이 있는 50 ml의 그레이너(Greiner) 원심분리 튜브
- [0082] - 밀리 큐(Milli Q) 워터 시스템
- [0083] - 델보테스트(Delvotest) SP NT 앰플(Ampoule)(또는 유사한 미생물 항생제 검정)
- [0084] - 메스 플라스크(100 ml 및 200 ml, 멸균 및 밀리포어(Milipore) 워터로 4회 씻어냄).
- [0085] 화학물질:
- [0086] - 1N 수산화나트륨(β -락탐 부제)
- [0087] - 1N 염산(β -락탐 부제)
- [0088] - β -락타마제 BS(예를 들어, 공급처 AG 과학 제품 번호 L-2467)
- [0089] - 전지유(β -락탐 부제); 대안으로, 분유가 사용될 수 있음, 10 ml의 밀리 큐 워터 중 1 g의 분유. 우유는 동결기에 보관될 수 있다(보관 기간 3개월). 동결된 우유를 사용 전에 천천히 실온으로 해동시킨다.
- [0090] 모든 우유 공급원에 있어서, 우유가 검정에서 양성 반응을 제공하지 않는 것을 입증하는 것이 중요하다.
- [0091] - 페니실린 G K
- [0092] 용액 제제:
- [0093] - 희석용수: 40 ml의 밀리 큐 워터를 50 ml의 새로운 그레이너 원심분리 튜브에 첨가한다.
- [0094] - β -락타마제 용액: 2 ml의 원심분리 튜브에 50 mg을 칭량하고, 2 ml의 밀리 큐 워터를 첨가한다. 검정 동안 더 적거나 더 많은 양이 필요하다면, 양을 조정한다.
- [0095] - 1N 수산화나트륨: 50 ml의 새로운 그레이너 원심분리 튜브에 1 g의 NaOH를 칭량하고, 25 ml의 밀리 큐 워터에 용해시키고, 혼합한다.
- [0096] - 1N 염산: 50 ml의 새로운 그레이너 원심분리 튜브에 24 g의 밀리 큐 워터를 첨가하고, 0.9 ml의 진한 HCl을 첨가하고, 혼합한다.
- [0097] - 4 ppb 페니실린 G K 원액: 100 ml의 메스 플라스크에 정확히 44 mg의 페니실린 G K(90% 순도)를 칭량하고, 밀리 큐 워터로 용해시키고, 이로 채우고, 혼합한다(용액 A). 100 ml의 메스 플라스크에 1.0 ml의 용액 A를 첨가하고, 밀리 큐 워터로 채우고, 혼합한다(용액 B). 100 ml의 메스 플라스크에 1.0 ml의 용액 B를 첨가하고, 밀리 큐 워터로 채우고 혼합한다(용액 C). 50 ml의 그레이너 원심분리 튜브에 5.0 g의 용액 C를 칭량하고, 45.0 g의 우유를 첨가하고, 혼합한다(4 ppb 원액). 이러한 용액을 몇몇의 10 ml의 원심분리 튜브에 걸쳐 나누고, 모든 튜브를 개별 표지하고, -18°C 에서 동결시킨다(튜브 당 4 ml 및 보관 기간 3개월).
- [0098] - 2 ppb 페니실린 G K 시험 용액: 동결기로부터 원액 페니실린 G K 튜브를 취하고, 천천히 실온으로 해동시킨다. 600 μl 의 페니실린 G K 원액을 600 μl 의 전유와 혼합하고, 혼합한다.
- [0099] 시료추출 과정:
- [0100] 시료추출, 보관 및 수송 동안 β -락탐이 도입되지 않음을 보장하는 것이 중요하다. 오염 기회를 최소화하기 위하여, 하기의 단계가 필요하다:
- [0101] 1. 오염을 피하기 위하여 장갑을 끼고, 깨끗한 실험실 가운을 입는다.
- [0102] 2. 50 ml의 2개의 그레이너 원심분리 튜브를 40 ml의 시료로 채우고, 첨가 직후에 스크류 캡을 닫는다.
- [0103] 3. 시료 튜브를 표지하고, 표지 상의 글이 판독 가능한 것을 확인한다.
- [0104] 4. 2개의 튜브를 사용된 적이 없는 플라스틱 백에 직접적으로 두고, 그것을 케이블 타이로 닫는다.
- [0105] 5. 플라스틱 백도 또한 시료 튜브 그 자체에 언급된 동일한 정보로 표지한다.
- [0106] 6. 검정이 바로 실행되지 않는다면, 플라스틱 백 내의 2개의 시료 튜브를 -18°C 에 보관한다. -18°C 에서의 보관을 시료추출 15분 내에 행해야 한다.
- [0107] 전처리:

- [0108] 시료가 동결되면, 분석을 시행하기 1일 전에 냉장고(3 내지 10℃)에 시료를 둬으로써 시료를 해동시킨다.
- [0109] 1. 50 ml의 그레이너 원심분리 튜브에 2 g을 칭량하고, 25 ml의 밀리 큐 워터를 첨가하고, 균질한 현탁액이 될 때까지 혼합하고; 특히 건성 또는 건조된 시료의 경우에 2개의 상 모두가 완전히 혼합됨을 확실하게 한다.
- [0110] 2. 시료를 실온에서 적어도 10분 동안 진탕시킨다.
- [0111] 3. 1 N NaOH 또는 1 N HCl을 사용하여 pH를 6.2 내지 6.8로 조정한다.
- [0112] 4. 2개의 2 ml 원심분리 튜브를 채운다.
- [0113] 5. 14,000 rpm에서 10분 원심분리한다.
- [0114] 추가의 분석을 위해 더 투명한 상층을 사용할 것이다.
- [0115] 검정 사전-처리:
- [0116] 3가지의 상이한 검정에 대하여 3가지 상이한 시료 사전-처리가 존재하며; 요건에 따라, 이들 검정법 중 임의의 것 또는 전부가 수행될 수 있다:
- [0117] 1. 통상의 검정
- [0118] 2. 표준 첨가 검정
- [0119] 3. 효소 분해 검정
- [0120] 이들 상이한 사전-처리 작업의 시행 계획을 위하여, 효소 전처리에 적어도 2시간의 소요 시간이 걸리는 점을 고려한다.
- [0121] 1. 통상의 검정 사전-처리:
- [0122] 600 μ l의 투명한 시료 용액을 2.0 ml의 원심분리 튜브에 첨가하고, 600 μ l의 우유를 첨가하고, 바로 캡을 닫고, 혼합하며; 이러한 혼합물을 바로 분석할 수 있다.
- [0123] 2. 표준 첨가 검정 사전-처리:
- [0124] 600 μ l의 시료 용액을 2 ml의 원심분리 튜브에 첨가하고, 600 μ l의 2 ppb 페니실린 G K 시험 용액을 첨가하고, 캡을 닫고, 혼합하며; 이러한 혼합물을 바로 분석할 수 있다.
- [0125] 3. 효소 분해 검정 사전-처리:
- [0126] 700 μ l의 투명한 시료 용액을 2.0 ml의 원심분리 튜브에 첨가하고, 100 μ l의 B-락타마제 용액을 첨가하고, 바로 캡을 닫고, 혼합한다. 원심분리 튜브를 37℃의 수조에 2시간 동안 두고, 2시간 후에 냉각시키고, 700 μ l의 우유를 첨가하고, 혼합하며; 이러한 혼합물을 바로 분석할 수 있다.
- [0127] 항생제 결정 시행:
- [0128] 텔보테스트 SP NT 앰플(또는 유사품)과 함께 포함되는 바와 같은 일반 설명을 준수한다. 하기 표에서, 시료 표에 채워진 가상의 예가 제공되어 있다. 첫줄에는 블랭크(blank)(우유) 및 2 ppb 페니실린 G K 시험 용액이 첨가된다. 상이한 검정에 대하여 하기의 코드가 이러한 예에서 적용된다: 통상의 검정에 대하여 N; 표준 첨가 검정에 대하여 S; 효소 분해 검정에 대하여 E.

표: 시료 표의 예:

텔보테스트 시료 표					
A	B	C	D	E	줄
블랭크		2 ppb		블랭크	1
N1	N2				2
S1	S2				3
E1	E2				4
					5

- [0129]
- [0130] 모든 시료로부터 용액 100 μ l을 100 μ l의 에펜도르프 피펫을 사용하여 텔보테스트 SP NT 앰플 내에 도입한다.

피펫의 포인트를 사용하여, 앰플의 튜브 커버 탑(tube cover top)을 침투시킬 것이며, 100 μl 를 앰플에 첨가한다. 앰플을 65°C의 수조에 2.5시간 동안 둔다. 앰플을 테이프로 밀봉한다. 2.5시간 후에, 앰플을 수조로부터 제거한다. 블랭크가 황색인지를 확인하고, 그렇지 않다면, 수조에서 시간을 30분 연장한다.

[0131] 결과의 해석:

[0132] 황색은 음성이고, 보라색은 양성이다. 양성은 시료에 존재하는 향미생물 활성이 2 ppb보다 더 크다는 것을 의미한다(페니실린 G K로 계산).

[0133] 통상의 검정 결과:

[0134] - 보라색은 향미생물 활성이 2 ppb 초과이며, 황색이 2 ppb 미만임을 의미한다.

[0135] 표준 첨가 검정 결과:

[0136] - 시료가 통상의 검정에서 황색이고, 표준 첨가 검정에서 보라색이면: 향미생물 활성의 수준은 2 ppb 미만이다.

[0137] - 시료가 통상의 검정에서 황색이고, 표준 첨가 검정에서 황색이면: 매트릭스 효과 결과는 신뢰할 수 없다. 시료의 회석이 필요하다.

[0138] - 시료가 통상의 검정에서 보라색이면, 표준 첨가 검정이 사용될 수 없다.

[0139] 효소 분해 검정:

[0140] - 시료가 통상의 검정에서 보라색이고, 효소 분해 검정에서 보라색이면, 결과는 신뢰할 수 없다. 시료를 더 많은 양의 효소를 사용하여 재분석할 필요가 있다.

[0141] - 시료가 통상의 검정에서 보라색이고, 효소 분해 검정에서 황색이면: 향미생물 활성의 수준은 2 ppb 초과이다.

[0142] - 시료가 통상의 검정에서 황색이면, 효소 분해 검정은 사용될 임의의 추가의 정보를 제공하지 않는다.

[0143] 향미생물 활성의 계산:

[0144] 결과는 하기와 같이 계산될 수 있다(방법의 한계는 2 ppb이며, 2 ppb는 2 $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ 임):

[0145] - 시료: 80 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ 인 2 $\text{g} \cdot 25 \text{ ml}^{-1}$

[0146] - 우유로 2배 희석 => 40 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$

[0147] - 시료가 보라색을 띤다면, 2 μg 초과인 향미생물 활성이 40 g에 존재하는 것을 의미한다.

[0148] - 2 $\mu\text{g} \cdot 40 \text{ g}^{-1}$ => 50 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ => 50 ppb 초과인 향미생물 활성.

[0149] - 황색이면, 50 ppb 미만의 향미생물 활성.

[0150] 실시예 2

[0151] **우유가 첨가된 시료 및 우유가 첨가되지 않은 시료 중 항생제의 결정**

[0152] 2개의 시료, 블랭크(물) 및 2 ppb 페니실린 G K 시험 용액을 공급처의 메뉴얼과 비슷한 구매 가능한(네덜란드 델프트 소재의 디에스엠 푸드 스페셜티즈 비.브이(DSM Food Specialties B.V.)) 델보테스트 SP NT를 사용하여 분석하였다. 2개의 앰플을 블랭크 시료로 채웠다. 하나에는, 실시예 1에 약술된 설명에 따라 우유(네덜란드 슈퍼마켓으로부터의 보통의 저지방 우유를 본 실시예에서 사용함)를 첨가하고, 다른 것에는 동일한 양의 물을 첨가하였다. 또한, 2개의 앰플을 2 ppb 페니실린 G K 시험 용액으로 채우고, 다시 하나에는 실시예 1에 약술된 설명에 따라 우유를 첨가하고, 다른 것에는 동일한 양의 물을 첨가하였다. 시료가 채워진 앰플을 64°C +/- 2°C에서 인큐베이션시키고, 앰플 내의 한천의 색상을 몇몇의 시점에 가시적으로 기록하였다. 상기 실험을 5벌로 수행하고, 평균 관찰은 하기 표에 요약된 바와 같았다.

시간(분)	블랭크		페니실린 G K 시험 용액	
	우유 첨가	물 첨가	우유 첨가	물 첨가
60	---	---	---	---
120	-+	---	---	---
150	+++	---	---	---
165	+++	---	---	---
180	+++	-+	---	---
195	+++	-++	---	---
210	+++	+++	---	---

[0153]

[0154]

표에서 알 수 있는 바와 같이, 항생제가 존재하지 않는 블랭크 시료는 한천 층에서 미생물의 성장을 야기할 것이며, 이는 결과적으로, pH의 변화 및 보라색에서 황색으로의 지시약의 색상의 변화를 야기한다(표에서 기호 --+, -++ 및 +++는 각각 보라색에서 황색으로의 색상의 부분적인 내지 완전한 변화를 나타낸다). 페니실린 G K 시험 용액의 시료가 블랭크 시료에서 미생물의 성장에 대한 페니실린 G K의 억제 효과로 인해 임의의 색상 변화를 보이지 않는 한편, 색상 변화의 시작은 우유의 존재 하에 120분 후에 이미 관찰될 수 있지만, 이러한 관찰은 오직 첨가되는 우유의 부재 하에 180분 후에 이루어질 수 있다. 추가로, 완전한 색상 변화는 또한 우유의 존재 하에 더욱 신속하게 일어난다.

[0155]

실시예 3

[0156]

우유가 첨가되는 시료 및 우유가 첨가되지 않는 시료 중 항생제의 결정

[0157]

실시예 2를 다양한 다른 시료, 예를 들어, 공정 중 폐기물 스트림 및 발효 균사 필터 케이크의 추출물로 반복하였으며, 항생제가 시료 중에 존재하지 않는 경우에, 실시예 2에서 관찰되는 바와 같은 효과(우유의 부재 하의 지시약의 색상의 변화에 비한, 우유의 존재 하에서의 텔보테스트 SP NT 시험 앰플의 한천 층에서의 더 신속한 지시약의 색상의 변화)를 확인하였다.