



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0007312
(43) 공개일자 2017년01월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/14 (2006.01) C12N 1/20 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/14 (2013.01)
C12N 1/20 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-7032666
(22) 출원일자(국제) 2015년04월24일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2016년11월23일
(86) 국제출원번호 PCT/US2015/027652
(87) 국제공개번호 WO 2015/164827
국제공개일자 2015년10월29일
(30) 우선권주장
61/983,675 2014년04월24일 미국(US)

(71) 출원인
래피드 마이크로 바이오시스템스, 인코퍼레이티드
미국 마이애미 01854, 로웰, 웨스트, 포터컷 불러
바드 1001
(72) 발명자
샤라, 케이트
미국 뉴햄프셔 03062, 내슈아, 카스코 드라이브
9번지, 에이 아파트
슈웨독, 줄리
미국 마이애미 02476, 애링톤, 피드몬트가 21번지
보겔, 좀머
미국 마이애미 01854, 로웰, 퍼킨스가 21번지,
136호
(74) 대리인
김학제, 문혜정

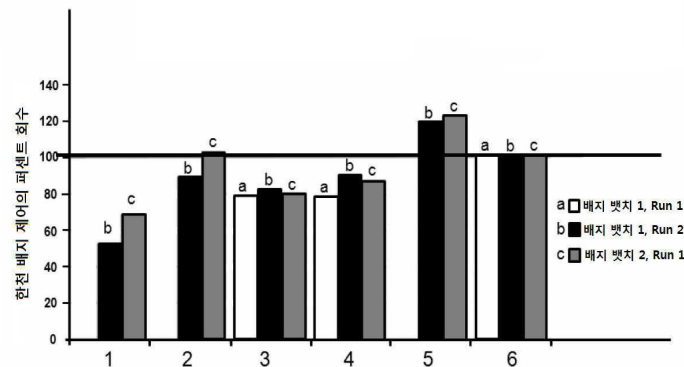
전체 청구항 수 : 총 47 항

(54) 발명의 명칭 미생물 성장 매체 및 이를 이용하는 방법

(57) 요약

본 발명은 막 상에 미생물의 성장을 지원할 수 있는 범용 미생물 성장 배지를 특징으로 한다. 배지는 카세인 소화물, 콩 소화물, 동물조직의 소화물, 효모추출물, 텍스트로오스, 포스페이트 완충액, 헤민, 및 L-시스틴을 포함한다.

대표도 - 도1



명세서

청구범위

청구항 1

카세인 소화물, 콩 소화물, 동물조직의 소화물, 효모추출물, 텍스트로오스, 포스페이트 버퍼, 헤민, 및 L-시스틴을 포함하는 조성물

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 조성물은 22℃에서 고체인, 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 조성물은 분말인, 조성물.

청구항 4

제2항 또는 3항에 있어서, 상기 조성물의 총 질량으로부터 상기 포스페이트 완충액을 제외하고, 상기 조성물은 약 1g/kg 내지 약 500g/kg 사이의 카세인 소화물을 포함하는, 조성물.

청구항 5

제2항에 있어서, 상기 조성물의 총 질량으로부터 상기 포스페이트 완충액을 제외하고, 상기 조성물은 약 0.5g/kg 내지 약 300g/kg 사이의 콩 소화물을 포함하는, 조성물.

청구항 6

제2항에 있어서, 상기 조성물의 총 질량으로부터 상기 포스페이트 완충액을 제외하고, 상기 조성물은 약 1g/kg 내지 약 500g/kg 사이의 동물조직의 소화물을 포함하는, 조성물.

청구항 7

제2항에 있어서, 상기 조성물의 총 질량으로부터 상기 포스페이트 완충액을 제외하고, 상기 조성물은 약 1g/kg 내지 약 500g/kg 사이의 효모추출물을 포함하는, 조성물.

청구항 8

제2항에 있어서, 상기 조성물의 총 질량으로부터 상기 포스페이트 완충액을 제외하고, 상기 조성물은 약 1g/kg 내지 약 500g/kg 사이의 텍스트로오스를 포함하는, 조성물.

청구항 9

제2항에 있어서, 상기 조성물은 수성 배지에서 용해시 0.1 mmol/(pH 단위) 내지 100 mmol/(pH 단위)의 완충 용

량을 제공하기에 충분한 포스페이트 완충액의 양을 포함하는, 조성물.

청구항 10

제2항에 있어서, 상기 조성물은 약 0.2g/kg 내지 약 1g/kg 사이의 헤민을 포함하는, 조성물.

청구항 11

제2항에 있어서, 상기 조성물의 총 질량으로부터 상기 포스페이트 완충액을 제외하고, 상기 조성물은 약 8g/kg 내지 약 40g/kg사이의 L-시스틴을 포함하는, 조성물.

청구항 12

제2항에 있어서, 상기 조성물은 계면활성제를 더 포함하는, 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 계면활성제는 폴리소르베이트인, 조성물.

청구항 14

제1항에 있어서, 22℃에서, 상기 조성물은 액체 또는 겔인, 조성물.

청구항 15

제1항 또는 14항에 있어서, 상기 조성물은 정제수를 더 포함하는, 조성물.

청구항 16

제1항 또는 14항에 있어서, 상기 조성물은 양 혈액을 더 포함하는, 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 조성물 내의 상기 양 혈액의 농도는 약 5 mL/kg 내지 약 200 mL/kg 사이인, 조성물.

청구항 18

제16항에 있어서, 상기 양 혈액은 용혈 양 혈액인, 조성물.

청구항 19

제14항에 있어서, 상기 조성물 내의 카세인 소화물의 농도는 약 0.1g/kg 내지 약 50g/kg 사이인, 조성물.

청구항 20

제14항에 있어서, 상기 조성물 내의 콩 소화물의 농도는 약 0.05g/kg 내지 약 30g/kg 사이인, 조성물.

청구항 21

제14항에 있어서, 상기 조성물 내의 동물조직의 소화물의 농도는 약 0.1g/kg 내지 약 50g/kg 사이인, 조성물.

청구항 22

제14항에 있어서, 상기 조성물 내의 효모추출물의 농도는 약 0.1g/kg 내지 약 50g/kg 사이인, 조성물.

청구항 23

제14항에 있어서, 상기 조성물 내의 텍스트로오스의 농도는 약 0.1g/kg 내지 약 50g/kg 사이인, 조성물.

청구항 24

제14항에 있어서, 상기 조성물은 0.1mmol/(pH 단위) 내지 100mmol/pH의 완충 용량을 제공하기에 충분한 포스페이트 완충액 양을 포함하는, 조성물.

청구항 25

제14항에 있어서, 상기 조성물 내의 헤민의 농도는 약 0.01g/kg 인, 조성물.

청구항 26

제14항에 있어서, 상기 조성물 내의 L-시스틴의 농도는 약 0.01g/kg 내지 약 0.5g/kg 사이인, 조성물.

청구항 27

제14항에 있어서, 상기 조성물은 계면활성제를 더 포함하는, 조성물.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 계면활성제는 폴리소르베이트인, 조성물.

청구항 29

제14항에 있어서, 상기 조성물은 겔화제를 더 포함하는, 조성물.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 겔화제는 한천, 젤란, 알긴산나트륨, 잔탄검, 구아검, 젤라틴, 아가로오스, 폴리아크릴아마이드, 및 *리조비움 sp.*(CNCM 번호: I-1809)에 의해 생성된 다당류로 구성된 군으로부터 선택되는, 조성물.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 겔화제는 한천인, 조성물.

청구항 32

제30항에 있어서, 상기 조성물 내의 상기 겔화제의 농도는 약 10g/kg이고, 상기 겔화제의 약 800g/kg는 고체이고, 약 5g/kg 내지 약 25g/kg 사이는 액체 또는 겔인, 조성물.

청구항 33

제1항 또는 14항에 있어서, 상기 조성물은 pH 7.3 \pm 0.5 인, 조성물.

청구항 34

제1항에 있어서, 상기 조성물은 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄(tris(hydroxymethyl)aminomethane)을 포함하지 않은, 조성물.

청구항 35

제1항에 있어서, 상기 조성물은 추가 나트륨을 포함하지 않는, 조성물.

청구항 36

제1항에 있어서, 상기 조성물은 살균 중화제를 더 포함하는, 조성물.

청구항 37

제36항에 있어서, 상기 중화제는 히스티딘, 티오설페이트, 폴리소르베이트 80 및/또는 레시틴인, 조성물.

청구항 38

세포 집단(population of cells)을 상기 세포 집단의 성장을 지원하는 조건하에 청구항 14항의 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는 세포 집단을 배양하는 방법.

청구항 39

제38항에 있어서, 상기 세포 집단은 막의 제1면 상에 배치되고, 상기 막의 제2면은 상기 조성물과 접촉하는, 세포 집단을 배양하는 방법.

청구항 40

제38항에 있어서, 상기 세포 집단 내 하나 이상의 세포는 호기성 균인, 세포 집단을 배양하는 방법.

청구항 41

제38항에 있어서, 상기 세포 집단 내의 하나 이상의 세포는 혐기성 미생물인, 세포 집단을 배양하는 방법.

청구항 42

제38항에 있어서, 상기 세포 집단 내 하나 이상의 세포는 *아시네토박터*, *아스페르길루스*, *바실러스*, *코리네박테리움*, *데르마코쿠스*, *대장균속*, *엑세로hilum*, *코쿠리아*, *메틸로박테리움*, *마이크로코커스*, *페니바실러스*, *페니실리움*, *프로피오니박테리움*, *슈도모나스*, *포도상구균*, *연쇄상구균*, 및 *스트렙토미세스*로 이루어진 군으로부터 선택되는 종(genus)에 속하는, 세포 집단을 배양하는 방법.

청구항 43

- i) 정제수, 카세인 소화물, 콩 소화물, 포스페이트 완충액, 텍스트로오스, 동물조직의 소화물, 효모추출물, 헤민, 및 L-시스틴을 포함하는 혼합물을 오토클레이빙(autoclaving)하는 단계;
- ii) 선택적으로 상기 혼합물을 냉각시키는 단계;
- iii) 선택적으로 살균 포타슘 하이드록사이드 또는 염화 수소를 상기 혼합물에 첨가하여 pH를 7.3 ± 0.5 로 조정하는 단계; 및
- iv) 양 혈액을 상기 혼합물에 첨가하는 단계를 포함하는, 청구항 14항의 조성물을 제조하는 방법.

청구항 44

제43항에 있어서, vi) 상기 혼합물의 색이 적색으로부터 갈색으로 변할 때까지 약 65℃에서 상기 혼합물의 온도를 유지시키는 단계를 추가로 포함하는, 청구항 14항의 조성물을 제조하는 방법.

청구항 45

제43항에 있어서, 상기 ii) 냉각 단계는 실온으로 냉각시키는, 청구항 14항의 조성물을 제조하는 방법.

청구항 46

제43항에 있어서, 상기 단계 i)의 혼합물은 겔화제를 추가로 포함하는, 청구항 14항의 조성물을 제조하는 방법.

청구항 47

제43항에 있어서, 상기 단계 i)의 혼합물은 계면활성제를 추가로 포함하는, 청구항 14항의 조성물을 제조하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 일반적으로, 본 발명은 미생물 성장 배지 및 이들의 사용방법에 관계한다.

배경 기술

[0002] 식품, 음료, 의료, 전자 및 제약 산업과 같은 많은 산업 분야에서 박테리아, 효모 또는 곰팡이와 같은 미생물에 의한 오염 정도를 신속하게 분석하는 것이 필수적이다. 특히, 제약 및 생물 제제 회사는 미생물 오염 물질의 존재에 대하여 살균 제품을 검사해야 한다. 전통적인 시험은, 미국 약전 논문 <71>에 기재된 바와 같이, 22.5℃에서 트립티케이스 소이 배지(trypsin casein soy broth, TSB) 및 32.5℃에서 유동 타이오글리콜레이트 배지(fluid

thioglycollate medium, FTM)을 사용하는 성장-기반 어세이다. TSB는 효모균, 곰팡이 및 호기성 박테리아를 검출하는데 사용되는 다용도 성장 배지이다.

[0003] FTM은 호기성 및 혐기성 층들을 가지고 편성혐기성세균(obligate anaerobes) 및 호기성 박테리아를 검출하는데 사용된다. 성장 조건들의 이러한 조합에 대한 목적은 가능한 많은 미생물들을 성장시키는 것이다. FTM이 혐기성 미생물을 성장시키는 능력을 갖지만, 이는 많은 층들에 대하여 제한된 성장 촉진 특성들을 갖는 좋지 않은 다용도 배지이다. 또한, FTM은 표면에서, 미생물, 특히 혐기성 유기체들의 성장을 지원하는 제한된 능력을 갖는다.

[0004] 새들러(Schaedler) 배지와 같은 다른 공지된 성장 배지는 특정 미생물의 성장을 지원하도록 특화된다. 예를 들어, 새들러 배지는 인간 병원균의 성장을 지원하는데 최적화되지만, 시험 살균 제품들은 가능한 많은 미생물의 성장을 지원할 수 있는 일반적인 배지를 필요로 한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 호기성 및 혐기성 박테리아, 특히 세포막의 성장을 지원할 수 있는 일반적인 성장 배지가 필요하다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명은 다른 배지보다 더 큰 범위로 혐기성 미생물, 곰팡이, 손상 포자들 및 일반 호기성 박테리아의 성장을 지원할 수 있는 범용의 미생물 성장 배지에 관한 것이다. 본 발명은 카세인 소화물(casein digest), 콩 소화물(soybean digest), 동물조직의 소화물(animal tissue digest), 효모추출물(yeast extract), 텍스트로오스(dextrose), 포스페이트 완충액(phosphate buffer)(예를 들어, 포타슘 포스페이트 완충액(potassium phosphate buffer)), 헤민(hemin), 및 L-시스틴(L-cystine)을 포함하는 조성물에 관한 것이다.

[0007] 제1의 양상에서, 조성물은 예를 들어, 22℃에서 분말인 고체이다. 제1 양상의 조성물의 구현예들이 표 1에 요약된다. 양은 전체 조성물의 킬로그램에 대한 개별 성분의 그램 단위로 제공되며, 당업자는 각각의 개별 성분의 총량이 1kg을 초과하지 않을 것임을 이해할 것이다.

표 1

구성요소	1 st 범위 (g/kg)	2 nd 범위(g/kg)	3 rd 범위 (g/kg)	비-제한적인 예(g/kg)
카세인 소화물	1-500	50-400	100-300	245.3
콩 소화물	0.5-300	10-200	10-100	43.8
동물조직의 소화물	1-500	50-400	100-300	219
효모추출물	1-500	50-400	100-300	219
텍스트로오스	1-500	50-400	100-300	255
헤민	0.1-2	0.2-1	0.3-0.5	0.4
L-시스틴	4-80	8-40	12-20	17.5
합계:	1000	1000	1000	1000

[0009] 특히 제1 양상의 구현예에서, 표1에 기재된 조성물들은 예를 들어, 디포타슘 하이드로젠 포스페이트(dipotassium hydrogen phosphate) 또는 이들의 수화물과 포타슘 디하이드로젠 포스페이트(potassium dihydrogen phosphate) 및 이들의 수화물의 혼합물과 같은 포스페이트 완충액을 더 포함한다.

[0010] 다른 구현예들에서, 제1 양상의 조성물에 존재하는, 예를 들어, 포타슘 포스테이트 완충액과 같은 포스페이트 완충액의 양은 표 1의 조성물 및 수성 배지(예를 들어, 정제수, 양 혈액(예를 들어, 탈삼유소 양 혈액 또는 용혈 양 혈액(laked sheep blood), 또는 모두)내의 포스페이트 완충액의 용해 또는 현탁에 의해 생성된 배지에서 0.1 mmol/(pH 단위) 내지 100 mmol/(pH 단위), 예를 들어, 1 mmol/(pH 단위) 내지 50 mmol/(pH 단위), 2 mmol/(pH 단위) 내지 20 mmol/(pH 단위), 또는 3 mmol/(pH 단위) 내지 10 mmol/(pH 단위)의 완충 용량을 제공하기에 충분하다. 다른 구현예들에서, 예를 들어, 포타슘 포스페이트 완충액인 포스페이트 완충액은 액체 또는 겔 조성물(예를 들어, pH 7.3 ± 0.2)에서 pH 7.3 ± 0.5를 생성하기에 충분한 양으로 존재한다.

[0011] 제1 양상의 임의의 구현예들에서, 조성물은 겔화제(gelling agent)를 더 포함한다. 조성물이 겔화제를 포함하면, 조성물은 약 10g/kg 내지 약 800g/kg 사이, 바람직하게 약 100g/kg 내지 약 600g/kg 사이, 및 보다

바람직하게 약 250g/kg 내지 약 450g/kg 사이의 겔화제(예를 들어, 한천(agar))(예를 들어, 약 350g/kg의 겔화제)를 포함한다. 임의의 구현예들에서, 겔화제는 한천일 수 있다. 다른 구현예들에서, 겔화제는 젤란, 알긴산나트륨, 잔탄검, 구아검, 폴리아크릴아마이드, 또는 엘라디움(Eladium™)이다.

[0012] 제1 양상의 임의의 구현예들에서, 조성물은 계면활성제를 더 포함한다. 제1 양상의 조성물은 표 1에 도시된 바와 같이 조성물의 약 0g/kg 내지 약 190g/kg, 예를 들어, 약 1g/kg 내지 약 60g/kg, 약 4g/kg 내지 약 40g/kg, 또는 약 20g/kg의 계면활성제를 포함할 수 있다. 계면활성제는 바람직하게 폴리소르베이트(polysorbate)(예를 들어, 또한 Tween® 20으로 알려진, 폴리소르베이트 20)이다.

[0013] 제2 양상에서, 조성물은 22℃에서 액체이고 제3 양상에서, 조성물은 22℃에서 겔이다. 액체 또는 겔은 충분한 물 또는 다른 수용액 또는 서스펜션을 포함하여 액체 또는 겔을 형성한다. 임의의 구현예들에서, 액체 또는 겔 조성물은 pH 7.3 ± 0.5 (예를 들어, pH 7.3 ± 0.2)이다.

[0014] 제2 또는 제3 양상의 조성물들이 표 2에 제공된다. 양은 전체 조성물의 킬로그램에 대한 개별 성분의 그램 단위로 제공되며(만일 존재하면, 용매 및 겔화제를 포함하여, 당업자는 각각의 개별 성분의 총량이 1kg을 초과하지 않을 것임을 이해할 것이다).

표 2

구성요소	1 st 범위 (g/kg) ¹	2 nd 범위 (g/kg)	3 rd 범위 (g/kg)	비-제한적인 예(g/kg)
카세인 소화물	0.1-50	1-20	2-10	5.6
콩 소화물	0.05-30	0.1-10	0.2-3	1
동물조직의 소화물	0.1-50	1-20	2-10	5
효모추출물	0.1-50	1-20	2-10	5
텍스트로오스	0.1-50	1-20	2-10	5.8
계면활성제	0-19	0.05-5	0.1-1	0.5
헤민	0.005-0.015	0.007-0.012	0.009-0.011	0.01
L-시스틴	0.01-0.5	0.01-0.5	0.01-0.5	0.4

[0016] 특정 구현예들에서, 제2 또는 제3 양상의 조성물은 수성 배지(예를 들어, 정제수, 양 혈액(예를 들어, 탈섬유소 양 혈액 또는 용혈 양 혈액, 또는 모두) 킬로그램당 표 1의 조성물의 5g 내지 100g, 예를 들어, 표 1의 조성물의 10g 내지 50g, 20g 내지 30g, 또는 약 23g을 포함한다.

[0017] 다른 제2 또는 제3 구현예에서, 표2에 인용된 조성물들은 예를 들어, 포타슘 포스페이트 완충액과 같은 포스페이트 완충액을 더 포함한다. 다른 구현예들에서, 제2 또는 제3 양상의 조성물 내에 존재하는 예를 들어, 포타슘 포스페이트 완충액인 포스페이트 완충액의 양은 0.1 mmol/(pH 단위) 내지 100 mmol/(pH 단위), 예를 들어, 1 mmol/(pH 단위) 내지 50 mmol/(pH 단위), 2 mmol/(pH 단위) 내지 20 mmol/(pH 단위), 또는 3 mmol/(pH 단위) 내지 10 mmol/(pH 단위)의 완충 용량(buffer capacity)을 제공하기에 충분하다.

[0018] 제2 또는 제3의 특정 구현예들에서, 조성물은 양 혈액(예를 들어, 탈섬유소 양 혈액 또는 용혈 양 혈액)을 더 포함한다. 조성물 내에서 양 혈액의 농도는 약 200 mL/kg 미만, 및 바람직하게 약 100 mL/kg (예를 들어, 약 50 mL/kg) 미만일 수 있다. 특정 구현예들에서, 양 혈액 내의 적혈구 세포들은 용해된다(예를 들어, 적혈구 세포들이 용해되도록 처리된 용혈 양 혈액 또는 탈섬유소 양 혈액).

[0019] 제2 또는 제3 양상의 특정 구현예들에서, 조성물은 계면활성제를 더 포함한다. 제2 또는 제3 양상의 조성물은 표2에 기재된 조성물의 0g/kg 내지 19g/kg 사이, 예를 들어, 약 0.05g/kg 내지 약 6g/kg 사이, 약 0.1g/kg 내지 약 4g/kg 사이, 또는 약 0.5g/kg의 계면활성제를 포함할 수 있다. 계면활성제는 바람직하게 폴리소르베이트(예를 들어, 또한 Tween® 20으로 알려진, 폴리소르베이트 20)이다.

[0020] 제2 양상 및 제3 양상의 특정 구현예에서, 조성물은 겔화제를 포함한다. 액체는 겔화제를 겔화하기에 불충분한 양으로 포함할 수 있다는 것이 이해되어야 한다. 예시적인 겔화제들은 한천, 젤란, 알긴산나트륨, 잔탄검, 구아검, 폴리아크릴아마이드, 및 엘라디움(Eladium™)이다.

[0021] 조성물 내에서 한천 또는 엘라디움™의 농도는 예를 들어, 약 5g/kg 내지 약 25g/kg 사이(예를 들어, 약 13.5g/kg)이다; 조성물 내에서 젤란의 농도는, 예를 들어, 약 1.0g/kg 내지 약 13g/kg 사이(예를 들어, 약

6.8g/kg) 이다; 조성물 내에서 잔탄검 또는 알긴산나트륨의 농도는 예를 들어, 약 3.4g/kg 내지 약 17g/kg 사이 (예를 들어, 약 9g/kg) 이다; 상기 조성물 내에서 폴리악릴아마이드의 농도는 예를 들어, 약 50g/kg 내지 약 200g/kg 사이(예를 들어, 약 150g/kg) 이다; 및

[0022] 상기 조성물 내에서 구아검의 농도는 예를 들어, 약 10g/kg 내지 약 40g/kg 사이(예를 들어, 약 21g/kg)이다.

[0023] 제1 내지 제3 양상을 통한 특정 구현예들에서, 배양 배지는 저항 세포(resistant cells)의 감수성 또는 저항성 시험 또는 선택에 대한, 항생제를 더 포함할 수 있다. 제1 내지 제3 양상을 통한 다른 구현예들에서, 성장 배지는 살균 중화제를 더 포함할 수 있다. 예시적인 중화된 살균제는 알코올(alcohols), 하이포아염소산염(hypochlorite), 과산화수소(hydrogen peroxide), 아세트산(acetic acid), 과산화아세트산(peroxyacetic acid), 사차암모늄화합물(quaternary ammonium compounds), 페놀류(phenolics), 아이오딘(iodine), 염소제제(chlorine preparations), 수은(mercurials), 포름알데히드(formaldehyde) 및 글루타르알데히드(glutaraldehyde)를 포함한다. 예시적인 중화제들은 히스티딘(histidine), 티오황산염(thiosulfate), 폴리소베이트 80(polysorbate 80), 및/또는 레시틴(lecithin)을 포함한다. 다른 중화제들은 중아황산염(bisulfite), 글리신(glycine), 이가양이온(예를 들어, Mg^{2+} 또는 Ca^{2+}) 및 티오글리콜레이트(thioglycollate)를 포함한다.

[0024] 네번째 양상에서, 본 발명은 세포군(population of cells)의 성장 지원 조건하에서 본 발명의 제2 또는 제3 양상에 의한 조성물을 세포군과 접촉시키는 것에 의해 세포군을 배양하는 방법에 관한 것이다.

[0025] 네번째 양상의 임의의 구현예들에서, 세포군은 투과성 막의 일면에 배치되고, 투과성 막의 타면은 본 발명의 제2 또는 제3 양상에 의한 조성물과 접촉한다. 투과성 막들은 다공성일 수 있고, 달리 일면으로부터 타면으로 성장 배지의 이송을 허용할 수 있다.

[0026] 네번째 양상의 특정 구현예들에서, 세포군은 호기성 균을 포함한다. 다른 구현예들에서, 세포군은 혐기성 미생물(예를 들어, 절대혐기성 미생물)을 포함한다. 네번째 양상의 특정 구현예들에서, 세포군은 아시네토박터(*Acinetobacter*) (예를 들어, *Acinetobacter lwoffii*), 아스페르길루스(*Aspergillus*) (예를 들어, 아스페르길루스 브라질리엔시스(*Aspergillus brasiliensis*) 또는 아스페르길루스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*), 바실러스(*Bacillus*) (예를 들어, 바실러스 클라우지(*Bacillus clausii*), 바실러스 이드리엔시스(*Bacillus idriensis*), 바실러스 리케니포미스(*Bacillus licheniformis*), 또는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)), 코리네박테리움(*Corynebacterium*) (예를 들어, 코리네박테리움 투베르쿨로스테아리쿰(*Corynebacterium tuberculostearicum*) 또는 코리네박테리움 제로시스(*Corynebacterium xerosis*)), 데르마코쿠스(*Dermacoccus*) (예를 들어, 데르마코쿠스 니시노미야엔시스(*Dermacoccus nishinomiyaensis*)), 대장균속(*Escherichia*) (예를 들어, 대장균(*Escherichia coli*), 엑세로hilum(*Exserohilum*) (예를 들어, 엑세로hilum 로스타툼(*Exserohilum rostratum*)), 코쿠리아(*Kocuria*) (예를 들어, 코쿠리아 리조필라(*Kocuria rhizophila*), 메틸로박테리움(*Methylobacterium*) (예를 들어, 메틸로박테리움 라디오톨레란스(*Methylobacterium radiotolerans*), 마이크로코커스(*Micrococcus*) (예를 들어, 마이크로코커스 루테우스(*Micrococcus luteus*), 페니바실러스(*Paenibacillus*) (예를 들어, 페니바실러스 글루카놀리티커스(*Paenibacillus glucanolyticus*), 페니실리움(*Penicillium*) (예를 들어, 페니실리움 크리소게눔(*Penicillium chrysogenum*) 또는 페니실리움 노트툼(*Penicillium notatum*)), 프로피오니박테리움(*Propionibacterium*)(예를 들어, 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*)), 슈도모나스(*Pseudomonas*) (예를 들어, 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*)), 포도상구균(*Staphylococcus*) (예를 들어, 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 표피포도상구균(*Staphylococcus epidermidis*), 또는 스태필로코커스 호미니스(*Staphylococcus hominis*)), 연쇄상구균(*Streptococcus*) (예를 들어, 화농연쇄상구균(*Streptococcus pyogenes*)), 및 스트렙토미세스(*Streptomyces*) (예를 들어, 스트렙토미세스 할스테디(*Streptomyces halstedii*))로 구성된 군으로부터 선택된 종(genus)에 속하는 세포들을 포함한다. 임의의 구현예들에서, 바실러스는 산화적으로 스트레스가 가해진다.

[0027] 네번째 양상의 임의의 구현예들에서, 세포군은 샘플이다. 샘플은 다세포 생물(예를 들어, 체액 또는 동물 조직(예를 들어, 인간 또는 비-인간 척추동물))로부터 수득된 체액 또는 조직을 포함할 수 있다. 샘플은 호흡기관(respiratory), 비뇨 생식기관(urogenital), 소화기관(digestive) 또는 생식관(reproductive tract), 중추신경계, 소변(urine), 피부(skin), 점액(mucus), 혈액(blood), 혈장(plasma), 혈청(serum), 림프(lymph), 뇌척수액(cerebrospinal fluid), 침(saliva), 손상조직(wound tissue), 상처 삼출물(wound exudate), 생체검사(biopsy), 대변(feces), 또는 고형 조직(solid tissue), 또는 이들의 유도체로부터 수득될 수 있다. 특정 구현예들에서, 샘플은 혈액 또는 소변 샘플이다. 샘플은 또한, 식물 또는 균류로부터 유도될 수 있다. 샘플은 주위 환경 공기, 토양, 또는 주위 환경에 노출된 물, 표면, 물체들(objects) 또는 유기체들을 샘플링하여 수득될 수

있다. 샘플은 인체 또는 동물의 국소용 또는 내부용 약제, 화장품, 혈액 또는 기타 제품의 제조에 있어서 원료, 완성품 또는 공정 중 물질; 식품, 음료 또는 영양 보충제(예를 들어, 비타민 또는 약초 추출물들)의 제조 과정에서 원료, 공정 중 또는 완성품; 의료용 또는 시험 관내 진단 장치의 제조시 원료, 공정 중 또는 완성품; 화학 제품; 산업 표면(industrial surfaces); 인스트루멘테이션(instrumentation); 및 기계류로부터 얻어질 수 있다. 샘플은 접촉 단계 이전에 액화 및/또는 균질화되도록 처리될 수 있다. 추가로 또는 대안으로, 접촉 단계 이전에, 샘플은 세포균과 다른 물질들 또는 물체들을 예를 들어, 여과 또는 침전에 의해 제거하도록 처리될 수 있다.

- [0028] 구체적 구현예에서, 방법은 샘플을 배양 배지의 세 개의 분리된 분취(aliquots)와 접촉하는 살균 검사인데, 하나는 예를 들어, 약 22℃의 실온에서 호기성으로 배양되고, 하나는 예를 들어, 약 32.5℃의 상승 온도에서 호기성으로 배양되고, 하나는 예를 들어, 약 32.5℃의 상승 온도에서 비호기성으로 배양된다.
- [0029] 다섯번째 양상에서, 본 발명은 본 발명의 제2 양상에 의한 조성물을 제조하는 방법에 관한 것이다. 방법은 다음을 포함한다:
- [0030] i) 정제수, 카세인 소화물, 콩 소화물, 포스페이트 완충액, 텍스트로오스, 동물조직의 소화물, 효모추출물, 헤민, 및 L-시스틴을 포함하는 혼합물을 오토클레이밍(autoclaving)하는 단계;
- [0031] ii) 선택적으로 혼합물을 실온으로 냉각시키는 단계;
- [0032] iii) 선택적으로 살균 포타슘 하이드록사이드 또는 염화 수소를 혼합물에 첨가하여 pH를 7.3 ± 0.2 로 조정하는 단계; 및
- [0033] iv) 양 혈액을 혼합물에 첨가하는 단계.
- [0034] 다섯번째 양상에서, 단계 iv) 이후에, 방법은 v) 혼합물의 색상이 적색에서 갈색으로 변할 때까지(예를 들어, 양 혈액이 탈섬유소 양 혈액인 경우) 혼합물의 온도를 약 65℃에서 유지하는 단계를 더 포함한다. 용혈 양 혈액이면, 단계 iv)는 45℃에서 또는 그 이하에서 일어날 수 있다.
- [0035] 다섯번째 양상의 특정 구현예들에서, 카세인 소화물, 콩 소화물, 포스페이트 완충액, 텍스트로오스, 동물조직의 소화물, 효모추출물, 헤민, 및 L-시스틴의 구성 요소의 양은 본 발명의 제1 양상에 기재된 것과 동일하다. 다섯번째 양상의 특정 구현예들에서, 양 혈액의 양은 본 발명의 제2 또는 제3 양상에 기재된 것과 동일하다.
- [0036] 다섯번째 양상의 특정 구현예에서, 단계 i)의 혼합물은 예를 들어, 한천(agar), 젤란(gellan), 알긴산나트륨(sodium alginate), 잔탄검(xanthan gum), 구아검(guargum), 폴리아크릴아마이드(polyacrylamide) 또는 EladiumTM과 같은 겔화제를 더 포함한다.
- [0037] 다섯번째 양상의 임의의 구현예에서, 단계 i)의 혼합물은 예를 들어, 폴리소르베이트(예를 들어, 폴리소르베이트 20)과 같은 계면활성제를 더 포함한다. 대안으로, 계면활성제는 단계 i) 이후에(예를 들어, 단계 iv) 또는 v) 이후에) 추가될 수 있다.
- [0038] 다섯번째 양상의 다른 구현예에서, 최종 조성물은 저장 용기(예를 들어, 병, 단지, 바이알, 앰플 또는 카세트(cassette)(예를 들어, W0 2013/070730에 기재된 카세트와 같은 카세트)) 내로 이송된다. 채워진 살균 저장 용기는 γ-조사되어 배지를 살균할 수 있다. 살균되는 γ-조사 용량은 10 kGy 이상, 예를 들어, 10 kGy 내지 50 kGy 사이, 10 kGy 내지 40 kGy 사이, 10 kGy 내지 30 kGy 사이, 또는 10 kGy 내지 20 kGy 사이(예를 들어, 12 kGy 내지 19 kGy 사이)일 수 있다.
- [0039] 본 발명의 양상의 임의의 구현예들에서, 조성물은 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄(tris(hydroxymethyl)aminomethane)을 포함하지 않는다. 본 발명의 양상의 특정 구현예들에서, 조성물은 추가 나트륨을 포함하지 않는다. 예를 들어, 어떠한 텍스트로오스, 포스페이트 완충액, 헤민, 및 L-시스틴도 나트륨을 포함하지 않는다.
- [0040] 본 발명의 양상의 다른 특정 구현예들에서 포스페이트 완충액은 하나 이상의 트리포타슘 포스페이트 또는 이들의 수화물, 디포타슘 하이드로젠 포스페이트 또는 이들의 수화물, 및 포타슘 디하이드로젠 포스페이트 또는 이들의 수화물을 포함한다. 특정 구현예들에서, 포스페이트 완충액은 하나 이상의 디포타슘 하이드로젠 포스페이트 또는 이들의 수화물 및 포타슘 디하이드로젠 포스페이트 또는 이들의 수화물을 포함한다. 다른 구현예들에서, 포스페이트 완충액은 디포타슘 하이드로젠 포스페이트 또는 이들의 수화물 및 포타슘 디하이드로젠 포스페이트 또는 이들의 수화물의 혼합물이다.

- [0041] 본 발명의 제1 양상의 임의의 구현예들에서, 조성물은 카세인 소화물, 콩 소화물, 동물조직의 소화물, 효모추출물, 텍스트로오스, 포스페이트 완충액, 예를 들어, 포타슘 포스페이트 완충액, 헤민, L-시스틴, 및 선택적으로 살균 중화제로 구성된다. 본 발명의 제1 양상의 특정 구현예들에서, 조성물은 카세인 소화물, 콩 소화물, 동물조직의 소화물, 효모추출물, 텍스트로오스, 포스페이트 완충액, 예를 들어, 포타슘 포스페이트 완충액, 헤민, L-시스틴, 겔화제 및 선택적으로 살균 중화제로 구성된다. 본 발명의 제2 양상의 특정 구현예들에서, 조성물은 카세인 소화물, 콩 소화물, 동물조직의 소화물, 효모추출물, 텍스트로오스, 포스페이트 완충액, 예를 들어, 포타슘 포스페이트 완충액, 헤민, L-시스틴, 정제수 및 선택적으로 살균 중화제로 구성된다. 본 발명의 제2 양상의 다른 구현예들에서, 조성물은 카세인 소화물, 콩 소화물, 동물조직의 소화물, 효모추출물, 텍스트로오스, 포스페이트 완충액, 예를 들어, 포타슘 포스페이트 완충액, 헤민, L-시스틴, 정제수, 양 혈액(예를 들어, 탈섬유소 양 혈액 또는 용혈 양 혈액) 및 선택적으로 살균 중화제로 구성된다. 본 발명의 제2 양상의 다른 구현예들에서, 조성물은 카세인 소화물, 콩 소화물, 동물조직의 소화물, 효모추출물, 텍스트로오스, 포스페이트 완충액, 예를 들어, 포타슘 포스페이트 완충액, 헤민, L-시스틴, 정제수, 양 혈액(예를 들어, 탈섬유소 양 혈액 또는 용혈 양 혈액), 계면활성제(예를 들어, 폴리소르베이트 20), 및 선택적으로 살균 중화제로 구성된다. 본 발명의 제3 양상의 특정 구현예들에서, 조성물은 카세인 소화물, 콩 소화물, 동물조직의 소화물, 효모추출물, 텍스트로오스, 포스페이트 완충액, 예를 들어, 포타슘 포스페이트 완충액, 헤민, L-시스틴, 정제수, 양 혈액(예를 들어, 탈섬유소 양 혈액 또는 용혈 양 혈액), 계면활성제(예를 들어, 폴리소르베이트 20), 및 선택적으로 살균 중화제로 구성된다. 본 발명의 제3 양상의 다른 구현예들에서, 조성물은 카세인 소화물, 콩 소화물, 동물조직의 소화물, 효모추출물, 텍스트로오스, 포스페이트 완충액, 예를 들어, 포타슘 포스페이트 완충액, 헤민, L-시스틴, 정제수, 양 혈액(예를 들어, 탈섬유소 양 혈액 또는 용혈 양 혈액), 계면활성제(예를 들어, 폴리소르베이트 20), 겔화제, 및 선택적으로 살균 중화제로 구성된다. 이러한 임의의 구현예들에서, 살균 중화제가 생략될 수 있다. 이러한 임의의 구현예들에서, 구성 요소들의 양은 표 1 또는 2에 기재된 바와 같을 수 있다.
- [0042] 본 발명의 임의의 양상의 조성물은 또한 염료 또는, 예를 들어, 5-브로모-4-클로로-3-인도릴-β-D-갈락토시드(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) (또한 X-Gal로도 알려짐; 이 시약은 베타-락타마아제 효소(β-lactamase enzyme)의 지시약이다.)와 같은 염색제, 특히 살아있는 세포에 대한 염색제를 포함할 수 있다. 이 시약은 테트라졸륨 염(tetrazolium salts) (예를 들어, 니트로블루 테트라졸륨(nitroblue tetrazolium) 또는 테트라졸륨 레드(tetrazolium red))와 함께 사용될 수 있다. 본 발명의 임의의 양상의 조성물 내에 사용될 수 있는 다른 염료들은 살몬-갈(Salmon-Gal), 마젠타-갈(Magenta-Gal) 및 그린-갈(green-Gal)을 포함한다.
- [0043] 본원에서 용어 "약"은 인용된 값의 ±10%의 값을 의미한다.
- [0044] 본원에서 용어 "완충 용량(buffer capacity)"은 액체 또는 겔 조성물의 pH를 1.0으로 변화시키는데 요구되는 1가의 강산 또는 1가의 강염기의 밀리몰(milimoles) 수를 의미한다.
- [0045] 단위 "g/kg," "mol/kg," 및 "mL/kg"은 조성물의 총 질량에 대한 성분 질량의 비율을 지시한다.
- [0046] 본원에서 용어 "정수(purified water)"는 미국 약전 및 국민의약품집(*United States Pharmacopeia and National Formulary*)(USF 37-NF32), monograph <1231>, 2014의 정제수에 대한 표준을 만족하거나 이를 초과하는 물을 의미한다.
- [0047] "실질적으로 나트륨 프리(free of sodium)"는 나트륨 이온 50g/kg 미만, 예를 들어, 10g/kg 미만 또는 1g/kg 미만의 나트륨 이온을 포함한다.

도면의 간단한 설명

도 1은 서로 다른 배지 개량(media modifications)을 갖는 Growth Direct™ 무균 카세트 내의 *B. 서브틸리스*의 블리치-스트레스가 가해진(bleach-stressed) 포자의 회수들(recoveries)에 대한 그래프이다. (1)로 라벨링된 바는 본래의 제조법에 따라 제조된 새들러 브로스(Schaedler broth)에 대한 데이터를 나타낸다. (2)로 라벨링된 바는 새들러 브로스에 대한 원래 방법에 따라, 하지만 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄 없이 제조된 성장 배지에 대한 데이터를 나타낸다. (3)으로 라벨링된 바는 새들러 브로스에 대한 원래 방법에 따라, 하지만 염화나트륨 없이 제조된 성장 배지에 대한 데이터를 나타낸다. (4)로 라벨링된 바는 새들러 브로스에 대한 원래 방법

에 따라, 하지만 칼륨원을 첨가하여 제조된 성장 배지에 대한 데이터를 나타낸다. (4)로 라벨링된 바는 새들러 브로스에 대한 원래 방법에 따라, 하지만 칼륨원을 첨가하여 제조된 성장 배지에 대한 데이터를 나타낸다. (5)로 라벨링된 바는 본 발명의 성장 배지에 대한 데이터를 나타낸다. (6)으로 라벨링된 바는 새들러 초콜렛 한천 배지에 대한 데이터를 나타낸다. 데이터는 새들러 초콜렛 한천 상에 관찰된 회수들로 정규화된다.

도 2는 Growth Direct™ 무균 카세트 내의 *B. 서브틸리스*의 블리치-스트레스가 가해진 포자의 회수들에 대한 그래프이다. (1)로 라벨링된 바는 새들러 블러드 브로스(Schaedler blood broth)에 대한 데이터를 나타낸다. (2)로 라벨링된 바는 본 발명의 성장 배지에 대한 데이터를 나타낸다. 성장 배지는 모든 새로운 성분의 개별 성분으로 준비되었다. 데이터는 새들러 초콜렛 한천 상에 관찰된 회수들로 정규화된다.

도 3은 Growth Direct™ 무균 카세트 내의 *메틸로박테리움 라디오톨레란스*의 회수들의 그래프이다. (1)로 라벨링된 바는 새들러 블러드 브로스에 대한 데이터를 나타낸다. (2)로 라벨링된 바는 본 발명의 성장 배지에 대한 데이터를 나타낸다. 펠트리 접시 상의 TSA에 대한 데이터는 (3)으로 라벨링된다. 펠트리 접시 상의 트립티케이스 소이 배지로부터 *M. 라디오톨레란스*의 회수로 데이터가 정규화되지 않을 수 있는데, 이는 *M. 라디오톨레란스*의 성장이 이 배지 상에서 관찰되지 않았기 때문이다.

도 4는 액체 배지 상에 성장한 서로 다른 9개의 미생물의 회수 그래프이다. (a)로 라벨링된 바는 TSB에 대한 데이터를 나타낸다. (b)로 라벨링된 바는 새들러 블러드 브로스에 대한 데이터를 나타낸다. (c)로 라벨링된 바는 본 발명의 성장 배지에 대한 데이터를 나타낸다. 데이터는 본 발명의 성장 배지의 관찰된 회수들에 대하여 정규화된다. 70% 컷오프는 본 발명의 성장 배지와 비교하여 낮은 성장을 지시한다. 142% 컷오프는 본 발명의 성장 배지와 비교하여 높은 성장을 지시한다. 142% 컷오프가 선택되어, 142%에 대한 100%는 70%를 가져온다.

도 5는 TSA 상의 동일한 회수들에 대하여 본 발명의 성장 배지 상에 성장한 서로 다른 10개의 스트레스가 가해진 미생물의 회수들의 그래프이다. 스트레스원은 블리치(bleach-stressed), 열, spor-klenz®(과산화수소, 과아세트산 및 아세트산의 혼합물), 티메로살 및 영양분으로 도면 내에 식별된다. 본 발명의 성장 배지 상의 회수들은 대응되는 스트레스가 가해진 미생물의 TSA 상의 회수들의 백분율로 도시된다.

도 6은 FTM 배지에서의 MPN 분석과 비교하여, 콜로니들(colonies)의 열거로 결정된 본 발명의 성장 배지 (a)에서의 혐기성 미생물 *C. 스포로진스* 및 *P. 아크네스*의 회수를 나타내는 그래프이다.

도 7은 폴리소르베이트 20이 있는(좌측바) 또는 폴리소르베이트 20 없이(중간바) 본 발명의 성장 배지 상에 블리치-스트레스가 가해진 *B. 서브틸리스*, *S. 자포니카*, 및 *D. 니시노미오야엔시스*의 회수들을 보여주는 그래프이다. 발명의 성장 배지에 대한 데이터는 TSA 상에 동일한 미생물의 회수들과 비교된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

성장 배지 조성물

본 발명은 인간-관련 유기체들, 혐기성 미생물, 수성 유기체들, 환경 유기체들, 및 곰팡이를 포함하는 다수의 종들로부터 광범위한 유기체들의 성장을 촉진하는 개선된 성장 배지를 제공한다. 따라서, 배지는 어세이들 및 세포 배양에 대한 다용도 배지로서 사용될 수 있다. 배지의 다양성은 무균 시험에서 트립티케이스 소이 배지(TSB) 및 타이오글라이콜산염액체배지(FTM)를 대신하여 사용되는 것을 허용한다. 본 발명의 성장 배지에 대한 사용의 예시적인 영역들은 일반적 세포 배양 및 시험 액체, 공기, 토양, 표면들, 산업 또는 임상 샘플들, 약학적 생산품들(살균 또는 비-살균), 음료 제품들, 또는 미생물 바이오버든(microbial bioburden)용 영양제들을 포함한다. 성장 배지는 또한 임상 분석, 예를 들어, 혈액 또는 기타 감염에 대한, 및 항생제 내성에 대한 분석과 같은 다른 분석에도 사용될 수 있다. 발명은 카세인 소화물, 콩 소화물, 동물조직의 소화물, 효모추출물, 텍스트로오스, 포스페이트 완충액, 헤민 및 L-시스틴을 포함하는 조성물로 특징된다. 조성물은 고형물 일 수 있으며, 액체(예를 들어, 물 및/또는 양 혈액(예를 들어, 탈섬유소 양 혈액 또는 용혈 양 혈액))와 혼합되어 본 발명의 성장 배지를 본 발명의 방법에 따라 제조할 수 있다. 조성물을 또한 계면활성제를 포함할 수 있다. 바람직하게, 조성물은 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄 및/또는 추가 나트륨을 포함하지 않는다. 생물학적으로 유도된 성분은 나트륨을 포함할 수 있기 때문에, 조성물은 나트륨-프리가 아니다. 본 발명의 조성물은 저-나트륨 함량이 새들러 브로스에서의 동일한 성장과 비교하여 산화-스트레스가 가해진 *B. 서브틸리스*의 우수한 성장을 제공하기 때문에 이점이 있다. 또한, 예를 들어, 트리스(Tris)보다 포타슘 포스페이트 완충액의 사용으로부터의 높은 포타슘 함량은 새들러 브로스에서의 동일한 성장과 비교하여 산화-스트레스가 가해진 *B. 서브틸리스*의 우수한 성장을 유도한다.

[0051] 본 발명이 속하는 분야의 당업자는 예를 들어, 헨더슨 하셀바흐 (Henderson-Hasselbalch) 방정식에서 관련 공액 산(conjugate acids)에 대하여 바람직한 pH 값과 수성 pKa 값을 사용하여, 통상적인 계산을 통해, 포스페이트 완충액 중의 포타슘 포스페이트 또는 이들의 수화물, 포타슘 하이드로젠 포스페이트 또는 이들의 수화물 및 포타슘 디하이드로젠 포스페이트 또는 이들의 수화물의 하나 이상의 최종 비율을 설정할 수 있다. 약 7.3(예를 들어, 7.3 ± 0.2 과 같은 7.3 ± 0.5)의 pH가 본 발명의 배지에 바람직하다.

[0052] 본 발명의 조성물의 비-제한적인 예시가 표 3에 제공된다.

표 3

[0053]

성분	양
카세인 소화물	5.6 g
콩 소화물	1 g
효모추출물	5 g
동물조직의 소화물	5 g
텍스트로오스	5.8 g
디포타슘포스페이트	2.5 g
1인산칼륨	0.31 g
L-시스틴	0.4 g
헤민	0.01 g

[0054] 표 3의 성분은 약 12 내지 약 15g의 한천(예를 들어, 약 13.5g 한천)을 포함할 수 있다. 조성물은 추가로 예를 들어, 약 950 mL의 정제수 및 약 50 mL의 양 혈액(예를 들어, 탈섬유소 양 혈액 또는 용혈 양 혈액)인 약 1 L의 수성 배지 내에 용해되거나 현탁될 수 있다. 조성물은 0.05% (w/v)의 폴리소르베이트 20을 더 포함할 수 있다. 비-제한적인 실시예에서, 표 3에 기재된 조성물은 950 mL의 정제수와 조합되는데, 50 mL의 양 혈액(예를 들어, 용혈된)을 추가로 포함할 수 있고, 10 mL의 5% (w/v) 폴리소르베이트 20 용액이 첨가될 수 있다.

[0055] 본 발명의 고체 조성물은 카세인 소화물, 콩 소화물, 동물조직의 소화물, 효모추출물, 텍스트로오스, 포스페이트 버퍼 헤민 및 L-시스틴을 포함한다. 본 발명의 특정 고체 조성물들은 약 60g/kg 미만(예를 들어, 약 55g/kg 미만 또는 약 50g/kg 미만)의 나트륨 이온을 포함한다. 본 발명의 고체 조성물들은 또한 겔화제를 포함할 수 있다. 겔화제를 포함하는 본 발명의 고체 조성물은 물, 양 혈액 또는 이들 모두와 혼합시 겔을 제공한다. 겔 화제의 비-제한적 예들은 한천, 젤란, 알긴산나트륨, 잔탄검, 구아검, 젤라틴(gelatin), 아가로오스(agarose), Eladium™ (리조비움 *sp.*(*Rhizobium sp.*)(CNCM 넘버: I-1809)에 의해 생성된 다당류) 및 이들의 조합을 포함할 수 있다. 본 발명이 속하는 분야의 당업자는 성장 배지로 사용하기에 적합한 겔의 준비에 필요한 액체(예를 들어, 정제수 및/또는 양 혈액)의 양을 결정할 수 있다. 본 발명의 고체 조성물에서의 겔화제의 양은 겔화제의 독자성(identity)에 의존한다. 예를 들어, 본 발명의 건조 고체에 존재하는 겔화제가 젤란인 경우, 그 농도는 약 50g/kg 내지 약 300g/kg 사이일 수 있고, 약 130g/kg 내지 약 230g/kg 사이(예를 들어, 약 180g/kg)일 수 있다. 본 발명의 겔 또는 액체 중에 존재하는 겔화제가 젤란인 경우, 농도는 약 2.5g/kg 내지 약 13g/kg 사이(예를 들어 약 6.8g/kg)일 수 있다. 다른 실시예에서, 본 발명의 건조 고체에 존재하는 겔화제가 잔탄검 또는 알긴산 나트륨인 경우, 그 농도는 약 70g/kg 내지 약 400g/kg 사이일 수 있고, 바람직하게 약 160g/kg 내지 약 300g/kg 사이(예를 들어, 약 220g/kg)일 수 있다. 예를 들어, 약 220g/kg). 본 발명의 겔화제가 잔탄검 또는 알긴산 나트륨인 경우, 그 농도는 약 70g/kg 내지 약 400g/kg 사이일 수 있고, 바람직하게 약 160g/kg 내지 약 300g/kg 사이(예를 들어, 약 220g/kg)일 수 있다. 예를 들어, 약 220g/kg). 본 발명의 겔 내에 존재하는 겔화제가 잔탄검 또는 알긴산 나트륨인 경우, 그 농도는 약 3.4g/kg 내지 약 13g/kg 사이(예를 들어, 약 6.8g/kg)일 수 있다. 또 다른 예에서, 본 발명의 겔 내에 존재하는 겔화제가 폴리아크릴아마이드인 경우, 그 농도는 약 50g/kg 내지 약 200g/kg 사이(예를 들어, 약 150g/kg)일 수 있다. 특정 예에서, 본 발명의 건조 고체에 존재하는 겔화제가 구아검인 경우, 그 농도는 약 400g/kg 내지 약 800g/kg 사이(예를 들어, 약 650g/kg)일 수 있다. 본 발명의 겔에 존재하는 겔화제가 구아검인 경우, 그 농도는 약 10g/kg 내지 약 40g/kg 사이(예를 들어, 약 21g/kg)일 수 있다.

[0056] 본 발명의 액상 조성물은 정제수 또는 양 혈액 또는 둘 다를 포함한다. 액상 조성물은 또한 겔을 형성하기에는 너무 낮은 농도의 겔화제를 포함할 수 있다. 본 발명의 액상 조성물 중 성분들의 농도는 본 명세서에 기재된 바와 같다.

- [0057] 본 발명의 조성물에 사용된 카세인 소화물은 소의 우유로부터 카세인 단백질을 가수 분해함으로써 당업계에 공지된 방법에 따라 제조할 수 있다. 본 발명의 조성물에 사용된 콩 소화물은 열에 민감한 프로테아제 억제제를 제거하기 위해 열처리된 탈지 대두분의 효소 분해를 통해 당업계에 공지된 방법에 따라 제조될 수 있다. 본 발명의 조성물에 사용된 동물조직의 소화물은 예를 들어, 근육 조직 또는 찌꺼기 및 젤라틴으로부터 고기의 가수 분해를 통해 당업계에 공지된 방법에 따라 제조될 수 있다. 효모 추출물은 USP에서 "효모 세포의 수용성 펩톤-유사 유도체([예를 들어,] *사카로미세스*)"로 정의되며 분무 건조 분말로 용이하게 입수할 수 있다. 상업적으로 입수할 수 있는 카세인 소화물, 콩 소화 물, 동물조직의 소화물 및 효모추출물이 본 발명의 조성물에 사용될 수 있다. 이러한 성분은 예를 들어, BD Biosciences(산 호세, CA)에서 얻을 수 있다. 이들 성분은 각각 15%(w/w) 미만의 나트륨을 함유한다.
- [0058] 탈섬유소 양 혈액은 당업계에 공지된 방법에 따라 양으로부터의 무균 혈액 수집 및 항응고제가 없는 경우에 수집된 혈액의 응고 과정 중 피브린의 기계적 제거에 의해 제조될 수 있다. 상업적으로 이용가능한 탈섬유소 양 혈액(예를 들어, Rockland Immunochemicals Inc., gilbertsville, PA로부터의)이 본 발명의 조성물 내에 사용될 수 있다. 양 혈액은 나트륨을 포함하는 것으로 알려진다($3.48 \pm 0.02\text{g}/100\text{ mL}$ 까지; 예를 들어, Long et al., *J. Anim. Sci.*, 24:145-150, 1965를 보라). 용혈 양 혈액은 탈섬유소 양 혈액의 용혈에 의해 제조될 수 있다. 상업적으로 입수가능한(예를 들어, Cedarlane, Burlington, NC로부터) 용혈 양 혈액이 본 발명의 조성물에 사용될 수 있다.
- [0059] 계면 활성제들(예를 들어, 비이온성 계면 활성제)이 본 발명의 액상 및 겔 조성물에서 침전물 형성을 제어하기 위해 본 발명의 조성물에 사용될 수 있다.
- [0060] 계면활성제들은 폴록사머(Poloxamer), 폴리소르베이트, 또는 TritonTM일 수 있다. 이러한 계면 활성제는 Dow Chemical, Midland, MI 및 Sigma Aldrich, St. Louis, MO와 같은 다양한 화학약품 공급자로부터 상업적으로 입수 가능하다. 바람직한 계면활성제는 폴리소르베이트 20이다.
- [0061] 본 발명의 성장 배지는 또한 당업계에 공지된 바와 같은 항생제를 포함할 수 있다. 성장 배지는 살균 중화제를 더 포함할 수 있다. 예시적인 중화된 살균제는 알코올, 하이포아염소산염, 과산화수소, 아세트산, 과산화아세트산, 제사암모늄화합물, 페놀류, 아이오딘, 염소 제제, 수은, 포름알데히드 및 글루타르알데히드를 포함한다. 예시적인 중화제는 히스티딘, 티오황산염, 폴리소르베이트 80, 및/또는 레시틴을 포함한다.
- [0062] 다른 중화제에는 바이설파이트(bisulfite), 글리신, 2가 양이온(예를 들어, Mg^{2+} 또는 Ca^{2+}) 및 티오글리콜레이트(thioglycollate)를 포함한다. 전술한 바와 같이, 본 발명의 조성물은 실질적으로 나트륨을 함유하지 않는 비생물학적으로 유래된 성분을 포함하며, 즉 본 발명의 조성물은 슈래더 브로스보다 적은 나트륨을 함유한다. 바람직하게 본 발명의 조성물은 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄(Tris)을 포함하지 않는다. Tris의 품질은 이 성분을 포함하는 배지에서 성장된 미생물의 회수율이 좋지 않은 결과를 가져올 수 있는 로트 간 변이(lot-to-lot variations)의 영향을 받기 때문에 이 성분의 부재가 유리하다. 따라서, 포스페이트 완충액, 예를 들어, 포타슘 포스페이트 완충액이 본 발명의 조성물에 사용된다.
- [0063] 세포 집단 배양방법(*Methods of Culturing a Population of Cells*)
- [0064] 본 발명의 성장 배지는 분석 및 세포 배양을 위한 일반적인 성장 배지로 사용될 수 있다.
- [0065] 본 발명의 성장 배지의 사용은 예를 들어, 미생물(예를 들어, 박테리아 또는 진균)의 성장을 위한 투과성 막을 사용하는 세포 배양 장치의 사용을 포함하는, 내 성장(ingrowth)에 기초한 무균 시험에 특히 유리하다. 이러한 세포 배양 장치는 국제공개 WO 2007/038478, WO 2013/070730 및 WO 2013/158666에 상세히 기재되어 있으며, 이들의 개시 내용은 그 전체가 본원에 참고로 포함된다. 특히, 본 발명의 성장 배지는 WO2013/070730에 기술된 방법에 따라 Growth DirectTM 무균 카세트와 함께 사용될 수 있다. 특별한 이점으로는 신뢰할 수 있는 무균 테스트 결과를 신속하게 달성할 수 있으므로 건강 관리 및 제조에 있어서 효율적인 비용 관리가 가능하다.
- [0066] 특히, 본 발명의 성장 배지는 TSA 및 FTM을 사용하는 비교 테스트(compendial test)와 유사하게 사용될 수 있다. 예를 들어, 배지는 32.5°C에서 배양한 호기성 균, 32.5°C에서 배양한 혐기성 미생물 및 22°C에서 배양한 호기성 균 중 하나에 대한 세 가지 시험 세트로 사용할 수 있다. 성장 배지의 다른 용도로는 환경 모니터링, 바이오버든 테스트, 임상 및 진단 용도, 항생제 내성 테스트 및 항생제 선택을 포함한다. 항생제 감수성을 시험하거나 항균제 내성을 가진 세포를 선택하기 위해서(예를 들어, 형질감염 후), 성장 배지는 당업계에 공지된 바와 같이 항생제를 포함할 수 있다.

- [0067] 본 발명의 성장 배지의 사용은 투과성 막 상에 미생물의 생육과 관련된 설정에 한정되지 않는다. 예를 들어, 본 발명의 성장 배지는 시험관, 페트리 플레이트, 로닥(Rodac) 플레이트, 마이크로 유체 세포 배양 장치(예를 들어, 미국특허공개 제2013/0090268호 및 제2013/0171679에 기재된 것들), 바이오리액터(Eppendorf CellGen® 바이오리액터 또는 예를 들어, 미국특허공개 제2013/0196375호 및 제2014/0024105호에 기재된 것) 및 기타 세포 배양 용기에서 미생물(예를 들어, 박테리아 또는 진균)을 배양하는데 사용될 수 있다.
- [0068] 본 발명의 성장 배지를 사용하여 분석될 수 있는 샘플은 제한되지 않으며, 산업 샘플(식품, 음료 또는 영양 보충제의 제조에서의 가공되지 않은, 가공 중 또는 완성 된 재료)을 포함한다; 의료용 또는 시험 관내 진단 장치의 제조시 원료, 공정 중 또는 완성품; 화학 제품; 산업 표면; 인스트루멘테이션; 또는 기계류), 의약품 제조에 사용되는 의약품 및 시약(예를 들어, 약학, 화장품, 혈액 또는 인체 또는 동물의 국소 또는 내부 사용을 위한 제조 과정에서 원료, 완성품 또는 공정 중 재료), 생물학적 샘플, 환경 샘플(물 샘플(예를 들어, 강, 호수, 연못, 대양과 같은) 물의 천연 지역, 폐수 및 처리된 물 공급원(도시 급수와 같은)), 공기 샘플, 토양 샘플, 및 표면 샘플). 검사되는 표면은 제품(예를 들어, 의약품)의 제조, 포장 또는 보관에 사용되는 장비, 재료 및 시설을 포함한다; 연구에 사용된 장비, 재료 및 시설; 의류, 침구 및 기타 직물(예를 들어, 의학적인 제공자 또는 환자에게); 치료에 사용된 장비, 재료 및 시설(예를 들어 병원, 진료소 및 의사 사무실).
- [0069] 본 발명의 성장 배지를 사용하여 배양할 수 있는 미생물(예를 들어, 박테리아 또는 진균)의 비-제한적인 예는 아시네토박터 (예를 들어, *Acinetobacter lwoffii*), 아스페르길루스(예를 들어, 아스페르길루스 브라실리엔시스 또는 아스페르길루스푸미가투스), 바실러스(예를 들어, 바실러스 클라우지, 바실러스 이드리엔시스, 바실러스 리케니포미스, 또는 바실러스 서브틸리스), 칸디다속(*Candida*)(예를 들어, 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)), 클로스트리듐속(*Clostridium*)(예를 들어, 클로스트리듐 스포로제니스(*Clostridium sporogenes*)), 코리네박테리움(예를 들어, 코리네박테리움 투베르쿨로스테아리컴 또는 코리네박테리움 체로시스), 테르마코쿠스(예를 들어, 테르마코쿠스 니시노미야엔시스), 대장균속(예를 들어, 대장균), 엑세로hilum(예를 들어, 엑세로hilum 로스타툼), 코쿠리아(예를 들어, 코쿠리아 리조필라), 메틸로박테리움(예를 들어, 메틸로박테리움 라디오톨레란스), 마이크로코커스(예를 들어, 마이크로코커스 루테우스), 페니바실러스(예를 들어, 페니바실러스 글루카놀리티커스), 페니실리움(예를 들어, 페니실리움 크리스게눔 또는 페니실리움 노타툼), 슈도모나스(예를 들어, 슈도모나스 에루지노사 또는 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*)), 스팅고모나스(*Sphingomonas*)(예를 들어, 스팅고모나스 자포니카(*Sphingomonas japonica*)), 포도상구균 (예를 들어, 황색포도상구균, 표피포도상구균, 또는 스태필로코쿠스 호미니스), 연쇄상구균(예를 들어, 화농연쇄상구균), 및 스트렙토미세스(예를 들어, 스트렙토미세스 할스테디이)를 포함한다. 특히, 본 발명의 성장 배지는 블리치-스트레스가 가해진 바실러스 서브틸리스(*B. subtilis*)를 포함하는 수많은 미생물의 재현 가능한 양호한 회수를 가능하게 한다.
- [0070] 발명의 키트(Kits of the Invention)
- [0071] 본 발명은 또한 전술한 본 발명의 조성물을 함유하는 키트를 특징으로 한다. 본 발명의 조성물은 예를 들어, 건조 제품, 분말, 겔 또는 액체로서 본 발명의 키트에 포함될 수 있다. 예를 들어, 분말인 고형분은 단일 용기(예를 들어, 병, 앰플 또는 단지)에 혼합물로 포장될 수 있다. 대안으로, 고형분은 별도의 용기(예를 들어, 가방, 캔, 파우치, 병, 약병, 앰플, 단지 또는 이들의 조합)으로 포장될 수 있다. 혼합물은 하나 이상의 카세인 소화물, 콩 소화물, 동물조직의 소화물, 효모추출물, 텍스트로오스, 포스페이트 버퍼, 헤민, L-시스틴, 및 겔화제(예를 들어, 한천, 젤란, 알긴산나트륨, 잔탄검, 구아검, 젤라틴, 아가로오스, EladiumTM, 또는 이들의 조합)를 포함할 수 있다. 이들 성분의 상대적인 양은 상술된 바와 같다.
- [0072] 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것이며, 본 발명을 어떠한 방식으로든 제한하려는 것은 아니다.
- [0073] 실시예
- [0074] 실시예 1: 본 발명의 성장 배지의 제조
- [0075] 정제수(950mL), 카세인 소화물(5.6g, BD Biosciences 또는 Neogen), 콩 소화물(1g, Neogen), 디포타슘포스페이트 (2.5g, Sigma-Aldrich), 텍스트로오스 (5.82g, Sigma-Aldrich), 동물조직의 소화물(5 g, BD Biosciences 또는 Neogen), 효모추출물 (5 g, BD Biosciences 또는 Neogen), 1인산칼륨(0.31 g, Sigma-Aldrich), 헤민 (0.01 g, Sigma-Aldrich), 및 L-시스틴 (0.4 g, Sigma-Aldrich)을 포함하는 조성물을 오토클레이브 하였다. 혼합물을 실온으로 냉각시키고, 수성 KOH 또는 HCl을 사용하여 pH를 7.3(± 0.2)로 조정하였다. 이어서, 상기 조성물을 65°C로 가열하고 50 mL의 탈슘요소 양 혈액(Northeast Laboratories 또는 Thermo Scientific)을 첨가하였다.

색깔이 적색에서 갈색으로 변할 때까지 온도를 일정하게 유지시켰으며, 이때 조성물을 주위 온도 (실온, 약 22 °C)로 냉각시켰다.

[0076] **실시예 2: 다양한 성장 배지 상에서 미생물의 성장 비교**

[0077] 이 실시예는 미합중국 약전(United States Pharmacopeia monograph) <71>에 기재된 성장 기반 무균 시험법에 사용된 표준 배지와 비교하여 다양한 미생물의 성장을 지원하는 본 발명의 성장 배지의 다양성을 설명한다. 표준 배지는 TSB 및 FTM 이다. 본 발명의 성장 배지는 다양한 유기체에 대하여 시험되었다. 본 발명의 배지는 또한 당업계에 공지된 다른 배지와 비교된다. 모든 시험은 Growth Direct™ 무균 카세트(Rapid Micro Biosystems, Bedford, MA) 또는 페트리 접시에서 수행되었다.

[0078] *본래의 제조법에 대한 새들러 브로스의 수정, 새들러 초콜렛 한천 및 본 발명의 성장 배지의 비교*

[0079] 본래의 제조법 (1)을 따라 제조된 새들러 브로스, Tris 없는 새들러 브로스 (2), 실질적으로 나트륨을 함유하지 않은 비-생물학적으로-유도된 성분을 포함하는 새들러 브로스 (3), 포타슘 (4)이 많은 새들러 브로스, 본 발명의 성장 배지 (5) 및 새들러 초콜렛 한천 (6)에 대한 블리치-스트레스가 가해진 *B. 서브틸리스*의 회수가 도 1에 도시되었다. 테스트는 각 배지의 두 가지 서로 다른 배지들로 3 중으로 수행되었다. 결과는 새들러 초콜렛 배지의 회수로 정규화되었다. 도 2에 도시된 바와 같이, 결과는 분말 성분들 및/또는 혈액의 상이한 기본 로트 (underlying lots)에도 불구하고 재현가능하다.

[0080] *페트리 플레이트상에서의 TSA를 이용한 회수에 대한 Growth Direct™ 무균 카세트에서 본 발명의 성장 배지의 회수 비교*

[0081] Growth Direct™ 무균 카세트내 본 발명의 성장 배지 위에서 서로 다른 23개의 유기체들의 성장이 페트리 접시의 TSB에 있는 동일한 유기체의 성장과 비교되었다. 결과는 페트리 플레이트 상의 TSA에서 관찰된 성장에 대해 정규화되었다. 오직 세 개의 유기체들만이 70% 컷오프(USP 표준) 아래에서 회수를 보였다. 두 개의 유기체들, *테르마코쿠스 니시노미야엔시스* 및 *M. 라디오톨레란스*의 경우, 본 발명의 성장 배지상의 무균 카세트의 성장은 지속적으로 우수했다. 도 3은 메틸로박테리움 라디오톨레란스에 대한 데이터를 나타낸다; 그러나, TSA에서 성장이 관찰되지 않았기 때문에 성장은 TSA에 대하여 정규화될 수 없었다.

[0082] *TSB, 새들러 블러드 브로스 및 본 발명의 배지를 이용한 Growth Direct™ 무균 카세트에서 미생물의 성장 비교*

[0083] 한천의 변이를 제거하기 위하여 무균 카세트의 컨텍스트(context) 내에서 다른 배지에서의 성장이 조사되었다. 연구의 초점은 문제가 되는 유기체들에 관한 것이었다. 도 4는 본 발명의 성장 배지에 대한 데이터를 정규화하여, 이러한 비교를 나타낸다. 다섯 개의 유기체들에 대하여, 모든 배지들 사이에 큰 차이가 없다. 모든 성장은 70%에서 142% 컷오프 사이이다. 두 개의 유기체들인 *C. 제로시스* 및 *엑세로hilum 로스타툼*의 경우, 본 발명의 성장 배지에서의 성장이 우수하다. *S. 할스테디* 및 *P. 크리소케눔*의 경우 TSB에서의 성장이 우수하지만 모든 경우에서 성장이 감지된다. TSA, TSB 또는 새들러 블러드 또는 초콜렛 한천에서 성장할 수 있는 유기체는 확인되지 않았으며, 이는 본 발명의 성장 배지 상에서 성장할 수 없다.

[0084] *FTM에 대한 동일한 미생물의 성장에 대한 본 발명의 성장 배지 상의 미생물 성장 비교*

[0085] FTM은 혐기성 미생물을 액체 형태로 성장시키기 위해 고안되었다. 배지는 호기성 및 혐기성 층을 모두 지니고 있어 범용 배지가 될 수 있다. 액체 성장 배지이기는 하지만 여과막 표면에서의 성장을 돕지 않기 때문에 탁도 (turbidity)가 있을 때만 성장을 모니터링할 수 있다.

[0086] 이러한 정보의 존재/부재 특성은 최적확수(Most Probable Number, MPN) 방법을 사용하여 정량적 데이터로 변환할 수 있는데, 이 방법에서는 낮은 레벨의 접종원(inocula)의 복제 10배 희석이 성장을 모니터링하고, 성장/비-성장 패턴이 가장 농축된 접종에 대하여 가장 가능성 있는 접종으로 전환될 수 있다.

[0087] 이 방법은 혐기성 무균 카세트의 *프로피오니박테리움 아크네스*(*Propionibacterium acnes*)의 성장을 본 발명의 성장 배지와 MPN 방법을 사용하여 FTM에서 비교하는 데 사용되었다. 표 4에 도시된 바와 같이, 혐기성 카세트에서의 카운트는 MPN 방법을 사용한 FTM에서의 카운트와 유사하다. 그러나, *P. 아크네스*는 FTM에서의 성장과 비교하여 본 발명의 성장 배지에서 상당히 더 빠르게 성장하였다.

표 4

Growth Direct™ 무균 카세트 및 FTM에서 프로피오니박테리움 아크네스의 회수		
FTM이 있는 혐기성 무균 카세트		
본 발명의 성장 배지(최적화수 분석)		
카운트	28.2	23
탐지 일수	< 5 일(눈에 의함)	> 7 일(눈에 의함)

FTM에서 일부 호기성 유기체의 성장을 본 발명의 성장 배지에서의 이들의 성장과 비교하였다. 이 테스트의 초점은 곰팡이에 있는데, 그 회수는 TSA에서의 성장과 비교할 때 본 발명의 성장 배지가 Growth Direct™ 무균 카세트에서 70% 미만으로 관찰되었다. MPN 분석이 FTM의 성장/비-성장 정보로부터 정량적 데이터를 얻기 위해 수행되었다. 표 5에 나타난 바와 같이, 곰팡이는 TSA 또는 새들러 초콜렛 한천(SCA)에서의 성장과 비교하여 FTM에서 매우 잘 성장하지 못하였다. 본 발명의 배지 상의 무균 카세트의 성장은 현저하게 우수하였다(6th 컬럼과 비교, FTM에서의 % 성장, 마지막 컬럼까지, 카세트에서의 % 성장. 성장은 TSA 대조군으로 정규화되었다.).

표 5

곰팡이 TSA, SCA, FTM 및 본 발명의 성장 배지의 회수

	32.5 °C					22.5 °C			22.5 °C
	TSA	SCA	FTM	FTM MPN	% TSA	TSA	SCA	TSB	카세트
아스페르길루스 브라질리엔시스(A. brasiliensis)	17.5	11.5	1/3	0.41	2%	17.5	13.0	3/3	76%
아스페르길루스 푸미가투스(A. fumigatus)	17.0	11.5	2/3	1.1	6%	5.5	8.0	3/3	68%
페니실리움 크리소게눔(P. chrysogenum)	10.5	7.5	0/3	<0.41	<4%	4.5	10.0	3/3	37%

실시예 3

정제수(950mL), 카세인 소화물(5.6g), 콩 소화물(1g), 디포타슘포스페이트 (2.5g), 텍스트로오스 (5.82g), 동물 조직의 소화물(5 g), 효모추출물 (5 g), 1인산칼륨(0.31 g), 헤민 (0.01 g), L-시스틴 (0.4 g) 및 pH 7.3 ± 0.2의 용혈 양 혈액 (50 mL) 또는 탈섬유소 양 혈액(50 mL)을 포함하는 성장 배지 조성물이 사용되었다. 용혈 양 혈액을 포함하는 조성물은 실시예 1에 기재된 바와 같이 제조된 혼합물에 45°C 또는 차가운 온도에서 용혈 양 혈액을 첨가한 것을 제외하고 실시예 1에 기재된 바와 동일하게 제조되었다.

막 필터를 브로스가 담가진 패드(broth soaked pads)위에 두었다. 조성물의 성장 촉진은 인간 관련 균주, 수분 유기체, 효모, USP 미생물, 곰팡이 및 다수의 포자 형성 바실러스 sp.를 포함하는 시험 유기체군을 사용하여 트립티케이스 대두 한천(TSA)과 비교되었다(표 6). 표 6에서, %회수는 TSA에서의 회수 퍼센티지로서, 본 발명의 성장 배지(폴리소르베이트 20을 포함하지 않음)상의 미생물의 회수율을 지시한다.

표 6

용혈 또는 탈섬유소 혈액	유기체	% 회수
	토양 미생물	
탈섬유소 혈액	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	121
탈섬유소 혈액	<i>페니바실러스 글루카놀리티커스</i>	79
탈섬유소 혈액	<i>스트렙토미세스 할스테디</i>	71
탈섬유소 혈액	<i>바실러스 클라우지</i>	106
탈섬유소 혈액	<i>바실러스 리케니포미스</i>	100
	곰팡이 포자	

탈섀유소 혈액	페니실리움 노트툼	83
용혈 혈액	페니실리움 크리스소게눔	86
	수중 미생물	
용혈 혈액	메틸로박테리움 라디오톨레란스	213
용혈 혈액	스핑크모나스 자포니카	613
용혈 혈액	슈도모나스 플루오레센스	98
	USP 미생물	
용혈 혈액	대장균	88
용혈 혈액	황색포도상구균	84
용혈 혈액	슈도모나스 에루지노사	116
용혈 혈액	바실러스 서브틸리스	158
용혈 혈액	칸디다 알비칸스	113
용혈 혈액	아스페르길루스 브라질리엔시스	92
	인간-관련 미생물	
탈섀유소 혈액	표피포도상구균	92
탈섀유소 혈액	스타필로코쿠스 와르네리(staphylococcus warnerii)	96
탈섀유소 혈액	스타필로코쿠스 호미니스	104
탈섀유소 혈액	스타필로코쿠스 케피티스(staphylococcus capitis)	177
용혈 혈액	스타필로코쿠스 헤몰라이티쿠스(staphylococcus haemolyticus)	115
용혈 혈액	코리네박테리움 제로시스	6550
탈섀유소 혈액	코쿠리아 리조필라	106
용혈 혈액	테르마코쿠스 니시노미야엔시스	98
탈섀유소 혈액	코리네박테리움 투베르쿨로스테아리쿰	101
탈섀유소 혈액	마이크로코커스 루테우스	110
용혈 혈액	화농연쇄상구균	94

[0095] 또한, 본 발명의 성장 배지상의 스트레스가 가해진 미생물의 회수는 전술한 절차에 따라 TSA 상에의 회수와 비교되었다. 도 5에 도시된 바와 같이, 모든 블리치-스트레스, 열-스트레스 및 영양-스트레스가 가해진 미생물의 회수율은 TSA에 비하여 본 발명의 배지에서 우수하였다. 본 발명의 성장 배지 상의 por-klenz®-스트레스 및 티메로살-스트레스가 가해진 미생물의 회수가 TSA상의 미생물들과 비교되었다. 이 테스트에 사용된 본 발명의 성장 배지는 탈 섀유소 양 혈액은 있고, 폴리소르베이트 20은 없이 제조되었다.

[0096] 모든 경우에서, 본 발명의 성장 배지는 시험된 모든 균주에서 TSA와 동등하거나 더 우수한 성장 촉진을 나타냈다. 어떠한 경우에도 본 발명의 성장 배지 상의 시험 균주의 회수는 TSA의 회수보다 실질적으로 열등하지 않았다.

[0097] 또한, 본 발명의 배지의 성장은 비교 무균 시험에 의해 기술된 바와 같이 FTM에서 스파이크(spiked)되고 성장된 유기체로부터 계산된 MPN과 비교되었다.

[0098] 혐기성 유기체 *P. 아크네스* 및 *C. 스포로진스*는 혐기성 조건 하에서 본 발명의 성장 배지가 FTM과 동일한 성장 촉진을 나타내는지 보기 위하여 테스트되었다. 도시된 바와 같이, 두 균주 모두 FTM에서 배양하여 얻은 MPN과 비교하여, 본 발명의 성장 배지와 함께 셀룰로오스 패드에 혐기성으로 배양된 막 필터상에서 비교가능한 회수를 나타내었다(도 6).

[0099] 실시예 4

[0100] 정제수(950mL), 카세인 소화물(5.6g), 콩 소화물(1g), 디포타슘포스페이트 (2.5g), 텍스트로오스 (5.82g), 동물 조직의 소화물(5 g), 효모추출물 (5 g), 1인산칼륨(0.31 g), 헤민 (0.01 g), L-시스틴 (0.4 g) 및 용혈 양 혈

액 (50 mL) 및 pH 7.3 ± 0.2의 5% (w/v) 폴리소르베이트 20 10 mL를 포함하는 성장 배지 조성물이 사용되었다. 조성물은 실시예 1에 기술된 바와 같이 제조된 혼합물에 45°C 또는 더 차가운 온도에서 용혈 양 혈액을 첨가한 것을 제외하고 실시예 1에 기재된 바와 동일하게 제조되었다.

- [0101] 폴리소르베이트 20을 함유하는 본 발명의 배지상에 블리치-스트레스가 가해진 *B. 서브틸리스*, *S. 자포니카*, 및 *D. 니시노미야엔시스*(*D. nishinomiyensis*)의 성장이 폴리소르베이트 20이 없는 본 발명의 배지 상의 성장 및 TSA 상의 성장과 비교되었다. 결과들이 도 7에 도시된다.
- [0102] 폴리소르베이트 20을 포함하는 본 발명의 성장 배지는 또한 혐기성 미생물 (*P. 아크네스*)의 성장 배지를 지원하는 능력에 대하여 테스트되었다. *P. 아크네스*는 본 발명의 생선 배지를 사용한 Growth Direct™ 혐기성 무균 카세트 상에서 성장되었고, 회수는 BD 혐기성 GasPak™ 파우치의 혈액 한천 플레이트에서의 성장과 비교되었다. 본 발명의 성장 배지 상의 *P. 아크네스*의 회수는 혈액 한천 제어에 대한 18CFU와 비교하여 평균 13.2CFU 이었다.
- [0103] 본 발명은 또한 다음 번호가 부여된 구현예들에 의해 설명된다.
- [0104] 1. 카세인 소화물, 콩 소화물, 동물조직의 소화물, 효모추출물, 텍스트로오스, 포스페이트 버퍼, 헤민, 및 L-시스틴을 포함하는 조성물.
- [0105] 2. 구현예 1의 조성물에서, 22°C에서, 상기 조성물은 고체이다.
- [0106] 3. 구현예 2의 조성물에서 2, 상기 조성물은 분말이다.
- [0107] 4. 구현예 2 또는 3의 조성물에, 상기 조성물의 총 질량으로부터 상기 포스페이트 완충액을 제외하고, 상기 조성물은 약 1g/kg 내지 약 500g/kg 사이의 카세인 소화물을 포함한다.
- [0108] 5. 구현예 4의 조성물에서, 상기 조성물의 총 질량으로부터 상기 포스페이트 완충액을 제외하고, 상기 조성물은 약 50g/kg 내지 약 400g/kg 사이의 카세인 소화물을 포함한다.
- [0109] 6. 구현예 5의 조성물에서, 상기 조성물의 총 질량으로부터 상기 포스페이트 완충액을 제외하고, 상기 조성물은 약 100g/kg 내지 약 300g/kg 사이의 카세인 소화물을 포함한다.
- [0110] 7. 구현예 6의 조성물에서, 상기 조성물의 총 질량으로부터 상기 포스페이트 완충액을 제외하고, 상기 조성물은 약 245.3g/kg의 카세인 소화물을 포함한다.
- [0111] 8. 구현예 2 내지 7의 임의의 하나의 조성물에서, 상기 조성물의 총 질량으로부터 상기 포스페이트 완충액을 제외하고, 상기 조성물은 약 0.5g/kg 내지 약 300g/kg 사이의 콩 소화물을 포함한다.
- [0112] 9. 구현예 8의 조성물에서, 상기 조성물의 총 질량으로부터 상기 포스페이트 완충액을 제외하고, 상기 조성물은 약 10g/kg 내지 약 200g/kg 사이의 콩 소화물을 포함한다.
- [0113] 10. 구현예 9의 조성물에서, 상기 조성물의 총 질량으로부터 상기 포스페이트 완충액을 제외하고, 상기 조성물은 약 10g/kg 내지 약 100g/kg 사이의 콩 소화물을 포함한다.
- [0114] 11. 구현예 10의 조성물에서 10, 상기 조성물의 총 질량으로부터 상기 포스페이트 완충액을 제외하고, 상기 조성물은 약 43.8g/kg의 콩 소화물을 포함한다.
- [0115] 12. 구현예 2 내지 11의 임의의 하나의 조성물에서, 상기 조성물의 총 질량으로부터 상기 포스페이트 완충액을 제외하고, 상기 조성물은 약 1g/kg 내지 약 500g/kg 사이의 동물조직의 소화물을 포함한다.
- [0116] 13. 구현예 12의 조성물에서, 상기 조성물의 총 질량으로부터 상기 포스페이트 완충액을 제외하고, 상기 조성물은 약 50g/kg 내지 약 400g/kg 사이의 동물조직의 소화물을 포함한다.
- [0117] 14. 구현예 13의 조성물에서, 상기 조성물의 총 질량으로부터 상기 포스페이트 완충액을 제외하고, 상기 조성물은 약 100g/kg 내지 약 300g/kg 사이의 동물조직의 소화물을 포함한다.
- [0118] 15. 구현예 14의 조성물에서, 상기 조성물의 총 질량으로부터 상기 포스페이트 완충액을 제외하고, 상기 조성물은 약 219g/kg의 동물조직의 소화물을 포함한다.
- [0119] 16. 구현예 2 내지 15의 임의의 하나의 조성물에서, 상기 조성물의 총 질량으로부터 상기 포스페이트 완충액을 제외하고, 상기 조성물은 약 1g/kg 내지 약 500g/kg 사이의 효모추출물을 포함한다.
- [0120] 17. 구현예 16의 조성물에서, 상기 조성물의 총 질량으로부터 상기 포스페이트 완충액을 제외하고, 상기 조성

물은 약 50g/kg 내지 약 400g/kg 사이의 효모추출물을 포함한다.

- [0121] 18. 구현예 17의 조성물에서, 상기 조성물의 총 질량으로부터 상기 포스페이트 완충액을 제외하고, 상기 조성물은 약 100g/kg 내지 약 300g/kg 사이의 효모추출물을 포함한다.
- [0122] 19. 구현예 18의 조성물에서 18, 상기 조성물의 총 질량으로부터 상기 포스페이트 완충액을 제외하고, 상기 조성물은 약 219g/kg의 효모추출물을 포함한다.
- [0123] 20. 구현예 2 내지 19의 임의의 하나의 조성물에서, 상기 조성물의 총 질량으로부터 상기 포스페이트 완충액을 제외하고, 상기 조성물은 약 1g/kg 내지 약 500g/kg 사이의 텍스트로오스를 포함한다.
- [0124] 21. 구현예 20의 조성물에서, 상기 조성물의 총 질량으로부터 상기 포스페이트 완충액을 제외하고, 상기 조성물은 약 50g/kg 내지 약 400g/kg 사이의 텍스트로오스를 포함한다.
- [0125] 22. 구현예 21의 조성물에서, 상기 조성물의 총 질량으로부터 상기 포스페이트 완충액을 제외하고, 상기 조성물은 약 100g/kg 내지 약 300g/kg 사이의 텍스트로오스를 포함한다.
- [0126] 23. 구현예 22의 조성물에서, 상기 조성물의 총 질량으로부터 상기 포스페이트 완충액을 제외하고, 상기 조성물은 약 255g/kg의 텍스트로오스를 포함한다.
- [0127] 24. 구현예 2 내지 23의 임의의 하나의 조성물에서, 상기 조성물은 수성 배지에서 용해시 0.1 mmol/(pH 단위) 내지 100 mmol/(pH 단위)의 완충 용량을 제공하기에 충분한 포스페이트 완충액의 양을 포함한다.
- [0128] 25. 구현예 24의 조성물에서, 상기 조성물은 수성 배지에서 용해시 1 mmol/(pH 단위) 내지 50 mmol/(pH 단위)의 완충 용량을 제공하기에 충분한 포스페이트 완충액의 양을 포함한다.
- [0129] 26. 구현예 25의 조성물에서, 상기 조성물은 수성 배지에서 용해시 2 mmol/(pH 단위) 내지 20 mmol/(pH 단위)의 완충 용량을 제공하기에 충분한 포스페이트 완충액의 양을 포함한다.
- [0130] 27. 구현예 26의 조성물에서, 상기 조성물은 수성 배지에서 용해시 3mmol/(pH 단위) 내지 10mmol/(pH 단위)의 완충 용량을 제공하기에 충분한 포스페이트 완충액의 양을 포함한다.
- [0131] 28. 구현예 2 내지 27의 임의의 하나의 조성물에서, 상기 조성물은 약 0.2g/kg 내지 약 1g/kg 사이의 헤민을 포함한다.
- [0132] 29. 구현예 28의 조성물에서, 상기 조성물은 약 0.4g/kg의 헤민을 포함한다.
- [0133] 30. 구현예 2 내지 29의 임의의 하나의 조성물에서, 상기 조성물의 총 질량으로부터 상기 포스페이트 완충액을 제외하고, 상기 조성물은 약 8g/kg 내지 약 40g/kg사이의 L-시스틴을 포함한다.
- [0134] 31. 구현예 30의 조성물에서, 상기 조성물의 총 질량으로부터 상기 포스페이트 완충액을 제외하고, 상기 조성물은 약 12g/kg 내지 약 20g/kg사이의 L-시스틴을 포함한다.
- [0135] 32. 구현예 31의 조성물에서, 상기 조성물의 총 질량으로부터 상기 포스페이트 완충액을 제외하고, 상기 조성물은 약 17.5g/kg의 L-시스틴을 포함한다.
- [0136] 33. 구현예 2 내지 32의 임의의 하나의 조성물에서, 상기 조성물은 겔화제를 더 포함한다.
- [0137] 34. 구현예 33의 조성물에서, 상기 겔화제는 한천, 젤란, 알긴산나트륨, 잔탄검, 구아검, 젤라틴, 아가로오스, *리조비움 sp.* (CNCM 번호: I-1809)에 의해 생성된 다당류로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0138] 35. 구현예 34의 조성물에서, 상기 겔화제는 한천이다.
- [0139] 36. 구현예 33 내지 35의 임의의 하나의 조성물에서, 상기 조성물은 약 10g/kg 내지 약 800g/kg 사이의 상기 겔화제를 포함한다.
- [0140] 37. 구현예 36의 조성물에서, 상기 조성물은 약 100g/kg 내지 약 600g/kg 사이의 상기 겔화제를 포함한다.
- [0141] 38. 구현예 37의 조성물에서, 상기 조성물은 약 250g/kg 내지 약 450g/kg 사이의 상기 겔화제를 포함한다.
- [0142] 39. 구현예 38의 조성물에서, 상기 조성물은 약 350g/kg의 상기 겔화제를 포함한다.
- [0143] 40. 구현예 2 내지 39의 임의의 하나의 조성물에서, 상기 조성물은 계면활성제를 더 포함한다.

- [0144] 41. 구현예 40의 조성물에서, 상기 계면활성제는 폴리소르베이트이다.
- [0145] 42. 구현예 40 또는 41의 조성물에서, 상기 조성물은 약 0.4g/kg 내지 약 190g/kg 사이의 상기 계면활성제를 포함한다.
- [0146] 43. 구현예 42의 조성물에서, 상기 조성물은 약 4g/kg 내지 약 80g/kg 사이의 상기 계면활성제를 포함한다.
- [0147] 44. 구현예 43의 조성물에서, 상기 조성물은 약 4g/kg 내지 약 40g/kg 사이의 상기 계면활성제를 포함한다.
- [0148] 45. 구현예 44의 조성물에서, 상기 조성물은 약 20g/kg의 상기 계면활성제를 포함한다.
- [0149] 46. 구현예 1의 조성물에서 1, 22℃에서, 상기 조성물은 액체 또는 겔이다.
- [0150] 47. 구현예 1 또는 16의 조성물에서, 정제수를 더 포함한다.
- [0151] 48. 구현예 1, 46, 및 47의 임의의 하나의 조성물에서, 양 혈액을 더 포함한다.
- [0152] 49. 구현예 48의 조성물에서, 상기 조성물 내의 상기 양 혈액의 농도는 약 5 mL/kg 내지 약 200 mL/kg 사이이다.
- [0153] 50. 구현예 49의 조성물에서, 상기 조성물 내의 상기 양 혈액의 농도는 약 5 mL/kg 내지 약 100 mL/kg 사이이다.
- [0154] 51. 구현예 50의 조성물에서, 상기 조성물 내의 상기 양 혈액의 농도는 약 50 mL/kg 이다.
- [0155] 52. 구현예 48 내지 51의 임의의 하나의 조성물에서, 상기 양 혈액에서 적혈가 용혈(lysed)된다.
- [0156] 53. 구현예 48 내지 52의 임의의 하나의 조성물에서, 상기 양 혈액은 용혈 양 혈액이다.
- [0157] 54. 구현예 48 내지 52의 임의의 하나의 조성물에서, 상기 양 혈액은 탈섬유소 양 혈액이다.
- [0158] 55. 구현예 46 내지 54의 임의의 하나의 조성물에서, 상기 조성물 내의 카세인 소화물의 농도는 약 0.1g/kg 내지 약 50g/kg 사이이다.
- [0159] 56. 구현예 55의 조성물에서, 상기 조성물 내의 카세인 소화물의 농도는 약 1g/kg 내지 약 20g/kg 사이이다.
- [0160] 57. 구현예 56의 조성물에서, 상기 조성물 내의 카세인 소화물의 농도는 약 2g/kg 내지 약 10g/kg 사이이다.
- [0161] 58. 구현예 57의 조성물에서, 상기 조성물 내의 카세인 소화물의 농도는 약 5.6g/kg 이다.
- [0162] 59. 구현예 46 내지 58의 임의의 하나의 조성물에서, 상기 조성물 내의 콩 소화물의 농도는 약 0.05g/kg 내지 약 30g/kg 사이이다.
- [0163] 60. 구현예 59의 조성물에서, 상기 조성물 내의 콩 소화물의 농도는 약 0.1g/kg 내지 약 10g/kg 사이이다.
- [0164] 61. 구현예 60의 조성물에서, 상기 조성물 내의 콩 소화물의 농도는 약 0.2g/kg 내지 약 3g/kg 사이이다.
- [0165] 62. 구현예 61의 조성물에서, 상기 조성물 내의 콩 소화물의 농도는 약 1g/kg 이다.
- [0166] 63. 구현예 46 내지 62의 임의의 하나의 조성물에서, 상기 조성물 내의 동물조직의 소화물의 농도는 약 0.1g/kg 내지 약 50g/kg 사이이다.
- [0167] 64. 구현예 의 조성물에서 63, 상기 조성물 내의 동물조직의 소화물의 농도는 약 1g/kg 내지 약 20g/kg 사이이다.
- [0168] 65. 구현예 64의 조성물에서, 상기 조성물 내의 동물조직의 소화물의 농도는 약 2g/kg 내지 약 10g/kg 사이이다.
- [0169] 66. 구현예 65의 조성물에서, 상기 조성물 내의 동물조직의 소화물의 농도는 약 5g/kg 이다.
- [0170] 67. 구현예 46 내지 66의 임의의 하나의 조성물에서, 상기 조성물 내의 효모추출물의 농도는 약 0.1g/kg 내지 약 50g/kg 사이이다.
- [0171] 68. 구현예 67의 조성물에서, 상기 조성물 내의 효모추출물의 농도는 약 1g/kg 내지 약 20g/kg 사이이다.
- [0172] 69. 구현예 68의 조성물에서, 상기 조성물 내의 효모추출물의 농도는 약 2g/kg 내지 약 10g/kg 사이이다.

- [0173] 70. 구현예 69의 조성물에서, 상기 조성물 내의 효모추출물의 농도는 약 5g/kg 이다.
- [0174] 71. 구현예 46 내지 70의 임의의 하나의 조성물에서, 상기 조성물 내의 텍스트로오스의 농도는 약 0.1g/kg 내지 약 50g/kg 사이이다.
- [0175] 72. 구현예 71의 조성물에서, 상기 조성물 내의 텍스트로오스의 농도는 약 1g/kg 내지 약 20g/kg 사이이다.
- [0176] 73. 구현예 72의 조성물에서, 상기 조성물 내의 텍스트로오스의 농도는 약 2g/kg 내지 약 10g/kg 사이이다.
- [0177] 74. 구현예 73의 조성물에서, 상기 조성물 내의 텍스트로오스의 농도는 약 5.8g/kg 이다.
- [0178] 75. 구현예 46 내지 74의 임의의 하나의 조성물에서, 상기 조성물은 0.1mmol/(pH 단위) 내지 100mmol/pH의 완충 용량을 제공하기에 충분한 포스페이트 완충액 양을 포함한다.
- [0179] 76. 구현예 75의 조성물에서, 상기 조성물은 수성 배지에서 용해시 1mmol/(pH 단위) 내지 50mmol/pH의 완충 용량을 제공하기에 충분한 포스페이트 완충액 양을 포함한다.
- [0180] 77. 구현예 76의 조성물에서, 상기 조성물은 수성 배지에서 용해시 2mmol/(pH 단위) 내지 20mmol/pH의 완충 용량을 제공하기에 충분한 포스페이트 완충액 양을 포함한다.
- [0181] 78. 구현예 77의 조성물에서, 상기 조성물은 수성 배지에서 용해시 3mmol/(pH 단위) 내지 10mmol/pH의 완충 용량을 제공하기에 충분한 포스페이트 완충액 양을 포함한다.
- [0182] 79. 구현예 46 내지 78의 임의의 하나의 조성물에서, 상기 조성물 내의 헤민의 농도는 약 0.01g/kg 이다.
- [0183] 80. 구현예 46 내지 79의 임의의 하나의 조성물에서, 상기 조성물 내의 L-시스틴의 농도는 약 0.01g/kg 내지 약 0.5g/kg 사이이다.
- [0184] 81. 구현예 80의 조성물에서, 상기 조성물 내의 L-시스틴의 농도는 약 0.4g/kg 이다.
- [0185] 82. 구현예 46 내지 81의 임의의 하나의 조성물에서, 상기 조성물은 계면활성제를 더 포함한다.
- [0186] 83. 구현예 82의 조성물에서, 상기 계면활성제는 폴리소르베이트이다.
- [0187] 84. 구현예 83의 조성물에서, 상기 조성물은 약 0.01g/kg 내지 약 5g/kg 사이의 상기 계면활성제를 포함한다.
- [0188] 85. 구현예 84의 조성물에서, 상기 조성물은 약 0.1g/kg 내지 약 2g/kg 사이의 상기 계면활성제를 포함한다.
- [0189] 86. 구현예 85의 조성물에서, 상기 조성물은 약 0.1g/kg 내지 약 1g/kg 사이의 상기 계면활성제를 포함한다.
- [0190] 87. 구현예 86의 조성물에서, 상기 조성물은 약 0.5g/kg 의 상기 계면활성제를 포함한다.
- [0191] 88. 구현예 46 내지 87의 임의의 하나의 조성물에서, 상기 조성물은 겔화제를 더 포함한다.
- [0192] 89. 구현예 88의 조성물에서, 상기 겔화제는 한천, 젤란, 알긴산나트륨, 잔탄검, 구아검, 젤라틴, 아가로오스, 폴리아크릴아마이드, 및 *리조비움* sp.(CNCM 번호: I-1809)에 의해 생성된 다당류로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0193] 90. 구현예 89의 조성물에서, 상기 겔화제는 한천이다.
- [0194] 91. 구현예 90의 조성물에서, 상기 겔화제는 *리조비움* sp.에 의해 생성된 다당류이다.
- [0195] 92. 구현예 90 또는 91의 조성물에서, 상기 조성물 내의 상기 겔화제의 농도는 약 5g/kg 내지 약 25g/kg 사이이다.
- [0196] 93. 구현예 92의 조성물에서, 상기 조성물 내의 상기 겔화제의 농도는 약 13.5g/kg 이다.
- [0197] 94. 구현예 93의 조성물에서, 상기 겔화제는 젤란이다.
- [0198] 95. 구현예 94의 조성물에서, 상기 조성물 내의 상기 젤란의 농도는 약 1.0g/kg 내지 약 13g/kg 사이이다.
- [0199] 96. 구현예 95의 조성물에서, 상기 조성물 내의 상기 젤란의 농도는 약 6.8g/kg 이다.
- [0200] 97. 구현예 89의 조성물에서, 상기 겔화제는 잔탄검 또는 알긴산나트륨이다.
- [0201] 98. 구현예 97의 조성물에서, 상기 조성물 내의 상기 겔화제의 농도는 약 3.4g/kg 내지 약 17g/kg 사이이다.

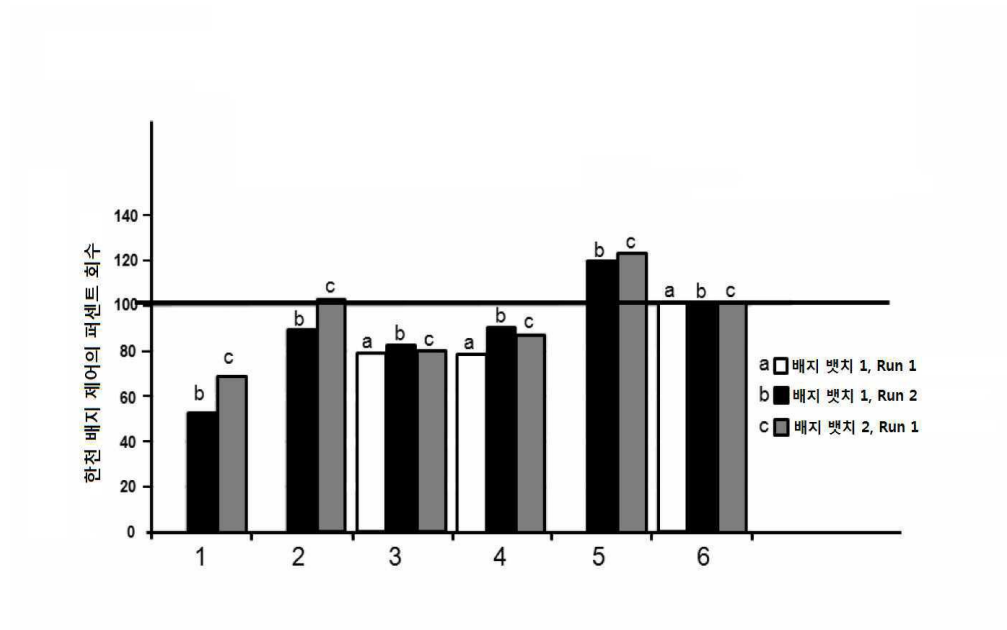
- [0202] 99. 구현예 98의 조성물에서, 상기 조성물 내의 상기 겔화제의 농도는 약 9g/kg 이다.
- [0203] 100. 구현예 89의 조성물에서, 상기 겔화제는 폴리아크릴아마이드이다.
- [0204] 101. 구현예 100의 조성물에서, 상기 조성물 내의 폴리아크릴아마이드의 농도는 약 50g/kg 내지 약 200g/kg 사이이다.
- [0205] 102. 구현예 101의 조성물에서, 상기 조성물 내의 폴리아크릴아마이드의 농도는 약 150g/kg 이다.
- [0206] 103. 구현예 89의 조성물에서, 상기 겔화제는 구아검이다.
- [0207] 104. 구현예 103의 조성물에서, 상기 조성물 내의 구아검의 농도는 약 10g/kg 내지 약 40g/kg 사이이다.
- [0208] 105. 구현예 104의 조성물에서, 상기 조성물 내의 구아검의 농도는 약 21g/kg 이다.
- [0209] 106. 구현예 46 내지 87의 임의의 하나의 조성물에서, 상기 조성물은 액체이다.
- [0210] 107. 구현예 46 내지 105의 임의의 하나의 조성물에서, 상기 조성물은 겔이다.
- [0211] 108. 구현예 1 및 46 내지 107의 임의의 하나의 조성물에서, 상기 조성물의 pH는 7.3 ± 0.5 이다.
- [0212] 109. 구현예 1 내지 108의 임의의 하나의 조성물에서, 상기 조성물은 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄 (tris(hydroxymethyl)aminomethane)을 포함하지 않는다.
- [0213] 110. 구현예 1 내지 109의 임의의 하나의 조성물에서, 상기 조성물은 추가 나트륨을 포함하지 않는다.
- [0214] 111. 세포 집단(population of cells)을 상기 세포 집단의 성장을 지원하는 조건하에 구현예 46 내지 110 중 어느 하나의 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는 세포 집단을 배양하는 방법.
- [0215] 112. 구현예 111의 방법에서, 상기 세포 집단은 막의 제1면 상에 배치되고, 상기 막의 제2면은 구현예 46 내지 110 중 어느 하나의 조성물과 접촉한다.
- [0216] 113. 구현예 112의 방법에서, 상기 막은 투과성이다.
- [0217] 114. 구현예 111 내지 113의 어느 하나의 방법에서, 상기 세포 집단 내 하나 이상의 세포는 호기성 균이다.
- [0218] 115. 구현예 111 내지 113의 어느 하나의 방법에서, 상기 세포 집단 내의 하나 이상의 세포는 혐기성 미생물이다.
- [0219] 116. 구현예 115의 방법에서, 상기 혐기성 미생물은 절대혐기성 미생물(obligate anaerobe)이다.
- [0220] 117. 구현예 111 내지 113의 어느 하나의 방법에 있어서, 상기 세포 집단 내 하나 이상의 세포는 아시네토박터, 아스페르길루스, 바실러스, 코리네박테리움, 테르마코쿠스, 대장균속, 엑세로hilum, 코쿠리아, 메틸로박테리움, 마이크로코커스, 페니바실러스, 페니실리움, 프로피오니박테리움, 슈도모나스, 포도상구균, 연쇄상구균, 및 스트렙토미세스로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0221] 118. 구현예 117의 방법에서, 상기 포도상구균은 황색포도상구균, 표피포도상구균, 또는 스태필로코커스 호미니스 이다.
- [0222] 119. 구현예 117의 방법에서, 메틸로박테리움은 메틸로박테리움 라디오톨레란스이다.
- [0223] 120. 구현예 117의 방법에서 117, 상기 바실러스는 바실러스 클라우지, 바실러스 이드리엔시스, 바실러스 리케니포미스, 또는 바실러스 서브틸리스이다.
- [0224] 121. 구현예 117 또는 120의 방법에서, 상기 바실러스는 산화적으로 스트레스가 가해진다.
- [0225] 122. 구현예 117의 방법에서, 상기 아스페르길루스는 아스페르길루스 브라실리엔시스 또는 아스페르길루스푸미가투스이다.
- [0226] 123. 구현예 117의 방법에서, 상기 코리네박테리움은 코리네박테리움 투베르쿨로스테아리쿰 또는 코리네박테리움 제로시스이다.
- [0227] 124. 구현예 117의 방법에서, 상기 테르마코쿠스는 테르마코쿠스 니시노미야엔시스이다.
- [0228] 125. 구현예 117의 방법에서, 상기 대장균속은 대장균이다.

- [0229] 126. 구현예 117의 방법에서, *코쿠리아*는 *코쿠리아 리조필라*이다.
- [0230] 127. 구현예 117의 방법에서, 상기 *마이크로코커스*는 *마이크로코커스 루테우스*이다.
- [0231] 128. 구현예 117의 방법에서, 상기 *페니바실러스*는 *페니바실러스 글루카놀리티커스*이다.
- [0232] 129. 구현예 117의 방법에서, 상기 *페니실리움*은 *페니실리움 크리스게눔* 또는 *페니실리움 노타툼*이다.
- [0233] 130. 구현예 117의 방법에서, 상기 *슈도모나스*는 *슈도모나스 에루지노사*이다.
- [0234] 131. 구현예 117의 방법에서, 상기 *연쇄상구균*은 *화농연쇄상구균*이다.
- [0235] 132. 구현예 117의 방법에서, 상기 *스트렙토미세스*는 *스트렙토미세스 할스테디*이다.
- [0236] 133. 구현예 117의 방법에서, 상기 *아시네토박터*는 *Acinetobacter lwoffii*이다.
- [0237] 134. 구현예 117의 방법에서, 상기 *프로피오니박테리움*은 *프로피오니박테리움 아크네스*이다.
- [0238] 135. 구현예 117의 방법에서, 상기 *엑세로hilum*은 *엑세로hilum 로스타툼*이다.
- [0239] 136. 구현예 111 내지 135의 어느 하나의 방법에 있어서, 상기 세포 집단은 샘플(sample)로부터 유래된다.
- [0240] 137. 구현예 136의 방법에서, 상기 샘플은 다세포 생물로부터 수득된 액체 또는 조직을 포함한다.
- [0241] 138. 구현예 137의 방법에서, 상기 샘플은 동물의 체액 또는 조직을 포함한다.
- [0242] 139. 구현예 138의 방법에서, 상기 샘플은 인간으로부터 유래된다.
- [0243] 140. 구현예 138의 방법에서, 상기 샘플은 인간이 아닌 척추 동물로부터 유래된다.
- [0244] 141. 구현예 137 내지 140의 어느 하나의 방법에 있어서, 상기 샘플은 호흡기관(respiratory), 비뇨 생식기관(urogenital), 생식관(reproductive tract), 중추신경계, 소변(urine), 혈액(blood), 진피(dermal), 혈장(plasma), 혈청(serum), 침(saliva), 손상조직(wound tissue), 상처 삼출물(wound exudate), 생체검사(biopsy), 대변(feces) 및 고형 조직(solid tissue) 샘플 및 이들의 유도체로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0245] 142. 구현예 141의 방법에서, 상기 샘플은 혈액 또는 소변 샘플이다.
- [0246] 143. 구현예 137의 방법에서, 상기 샘플은 식물에서 유래된다.
- [0247] 144. 구현예 136 내지 143의 어느 하나의 방법에 있어서, 상기 샘플은 환경에 노출된 환경 공기, 토양 또는 물, 표면, 물체(objects) 또는 유기체 샘플을 샘플링하여 얻어진다.
- [0248] 145. 구현예 136의 방법에서, 상기 샘플은 인체 또는 동물의 국소용 또는 내부용 약제, 화장품, 혈액 또는 기타 제품의 제조에 있어서 원료, 완성품 또는 공정 중 물질; 식품, 음료 또는 영양 보충제의 제조 과정에서 원료, 공정 중 또는 완성품; 의료용 또는 시험 관내 진단 장치의 제조시 원료, 공정 중 또는 완성품; 화학 제품; 산업 표면; 인스트루멘테이션(instrumentation); 및 기계류로 구성된 군으로부터 선택된 물질로부터 얻어진다.
- [0249] 146. 구현예 136 내지 145의 어느 하나의 방법에 있어서, 상기 샘플은 상기 접촉 전에 액화 및/또는 균질화되도록 처리된다.
- [0250] 147. 구현예 136 내지 146의 어느 하나의 방법에 있어서, 상기 샘플은 상기 접촉 전에 상기 세포 집단 이외의 물질 또는 대상을 제거하도록 처리된다.
- [0251] 148. 구현예 136 내지 146의 어느 하나의 방법에 있어서,
- [0252] i) 정제수, 카세인 소화물, 콩 소화물, 포스페이트 완충액, 텍스트로오스, 동물조직의 소화물, 효모추출물, 헤민, 및 L-시스틴을 포함하는 혼합물을 오토클레이빙(autoclaving)하는 단계;
- [0253] ii) 선택적으로 혼합물을 냉각시키는 단계;
- [0254] iii) 선택적으로 살균 포타슘 하이드록사이드 또는 염화 수소를 혼합물에 첨가하여 pH를 7.3 ± 0.5 로 조정하는 단계; 및
- [0255] iv) 양 혈액을 혼합물에 첨가하는 단계를 포함한다.

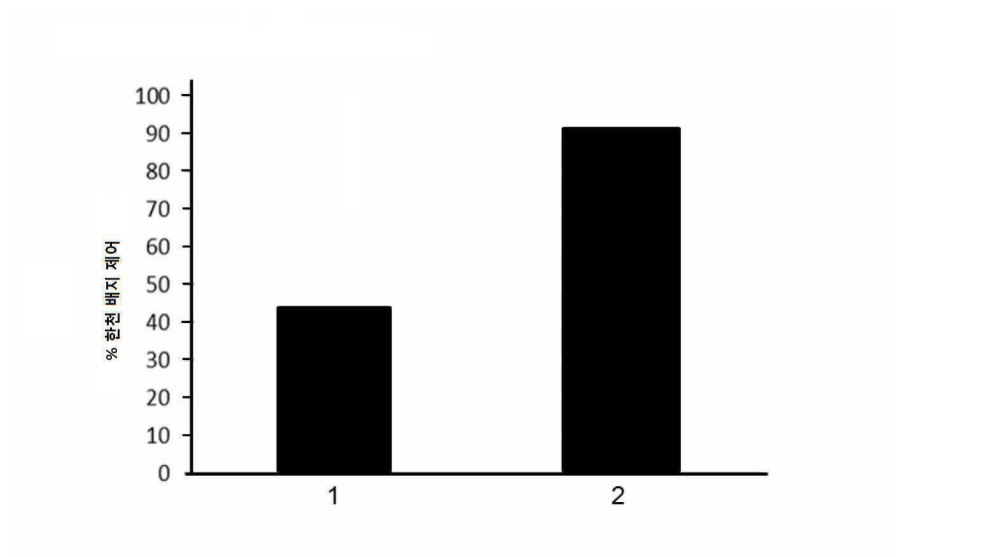
- [0256] 149. 구현예 148의 방법에서, vi) 상기 혼합물의 색이 적색으로부터 갈색으로 변할 때까지 약 65℃에서 상기 혼합물의 온도를 유지시키는 단계를 추가로 포함한다.
- [0257] 150. 구현예 148 또는 149의 방법에서, 상기 ii) 냉각 단계는 실온으로 냉각시킨다.
- [0258] 151. 구현예 148 또는 149의 방법에서, 상기 ii) 냉각 단계는 약 42℃로 냉각시킨다.
- [0259] 152. 구현예 148 내지 151의 어느 하나의 방법에 있어서, 상기 단계 i)의 혼합물은 겔화제를 추가로 포함한다.
- [0260] 153. 구현예 148 내지 152의 어느 하나의 방법에 있어서, 상기 단계 i)의 혼합물은 계면활성제를 추가로 포함한다.
- [0261] 154. 구현예 148 내지 152의 어느 하나의 방법에 있어서, 단계 i) 이후에 상기 혼합물에 계면 활성제를 첨가한다.
- [0262] 155. 구현예 153 또는 154의 방법에서, 상기 계면활성제는 폴리소르베이트이다.
- [0263] 156. 구현예 153 내지 155의 어느 하나의 방법에 있어서, 상기 계면활성제는 상기 계면활성제의 5% (w/v)를 포함하는 수용액으로 제공된다.
- [0264] 157. 구현예 148 내지 152의 어느 하나의 방법에 있어서, 준비 단계가 완료된 후에 상기 조성물을 저장 용기에 이송하는 단계를 더 포함한다.
- [0265] 158. 구현예 157의 방법에서, 상기 저장 용기는 병, 용기, 바이알, 앰플 또는 카세트이다.
- [0266] 159. 구현예 157 또는 158의 방법에서, 상기 이송 후에 상기 저장 용기에 γ -조사하는 단계를 더 포함한다.
- [0267] 160. 구현예 159의 방법에서, 상기 γ -조사의 투여량은 10 kGy 이상이다.
- [0268] 161. 구현예 160의 방법에서, 상기 γ -조사의 투여량은 약 10 kGy 내지 약 50 kGy 사이이다.
- [0269] 162. 구현예 161의 방법에서, 상기 γ -조사의 투여량은 약 10 kGy 내지 약 40 kGy 사이이다.
- [0270] 163. 구현예 162의 방법에서, 상기 γ -조사의 투여량은 약 10 kGy 내지 약 20 kGy 사이이다.
- [0271] 164. 구현예 163의 방법에서, 상기 γ -조사의 투여량은 약 12 kGy 내지 약 19 kGy 사이이다.
- [0272] 165. 구현예 1 내지 164의 어느 하나의 조성물 또는 방법에 있어서, 상기 조성물은 살균 중화제를 더 포함한다.
- [0273] 166. 구현예 165의 조성물 또는 방법에 있어서, 상기 중화제는 히스티딘, 티오설페이트, 폴리소르베이트 80 및/또는 레시틴이다.
- [0274] **다른 구현예들**
- [0275] 본 발명의 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 본 발명의 범위 및 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 본 발명의 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 다양한 변형 및 수정이 가능할 것이다. 본 발명은 특정 구현예들과 관련하여 설명되었지만, 청구된 본 발명이 이러한 특정 구현예에 부당하게 제한되어서는 안된다는 것을 이해해야 한다. 실제로, 당업자에게 자명한 본 발명을 수행하기 위한 기술된 방식들의 다양한 변형들이 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 의도된다.
- [0276] 다른 구현예들은 청구항들에 있다.

도면

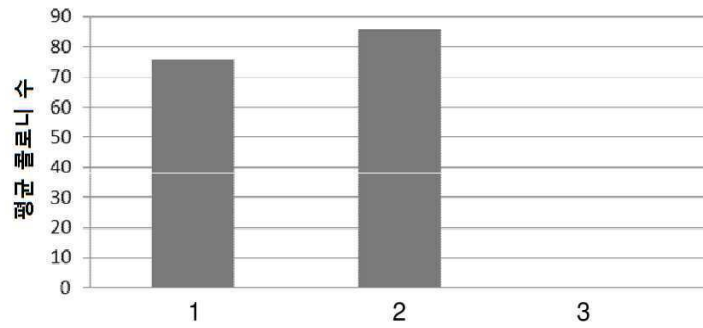
도면1



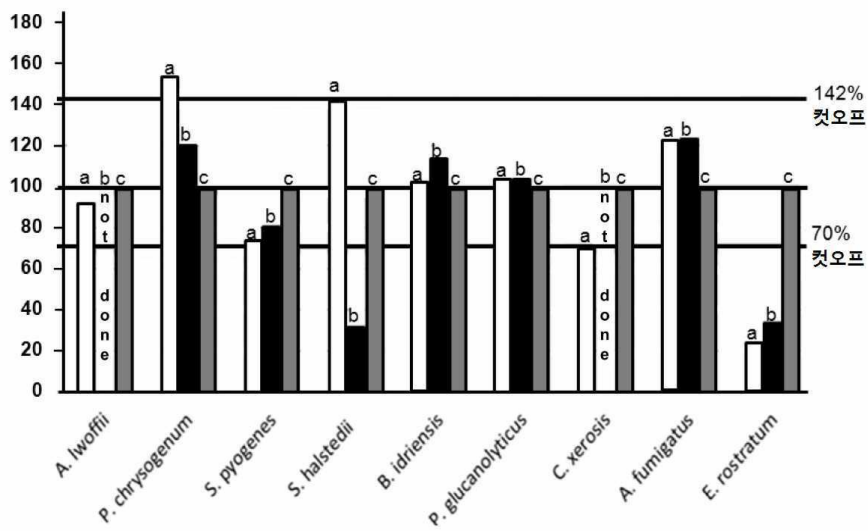
도면2



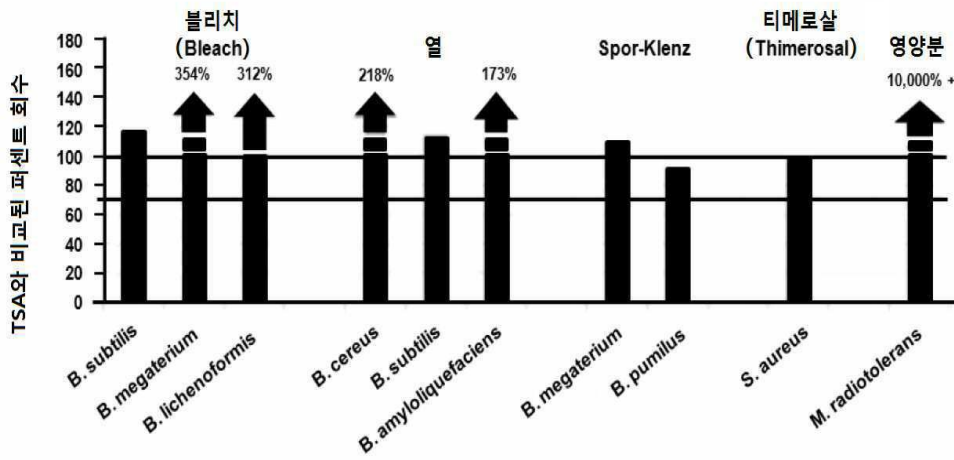
도면3



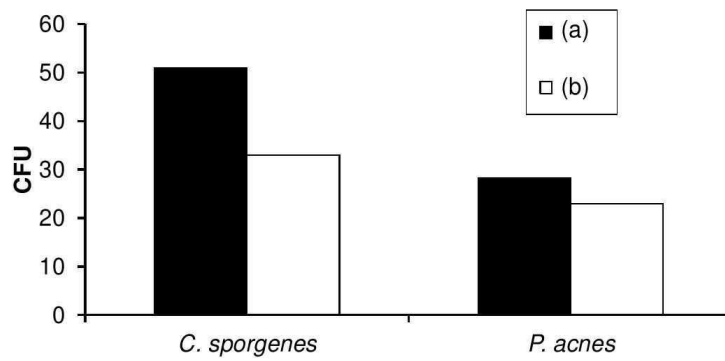
도면4



도면5



도면6



도면7

