



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0114313
(43) 공개일자 2015년10월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) C12N 1/38 (2006.01)
C12Q 1/04 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0038841
(22) 출원일자 2014년04월01일
심사청구일자 2014년04월01일

(71) 출원인
건국대학교 산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 120, 건국대학교내 (화양동)
(72) 발명자
서건호
서울특별시 서초구 서운로 211 삼호아파트 5-901
최정환
서울특별시 광진구 동일로30길 4
(74) 대리인
한양특허법인

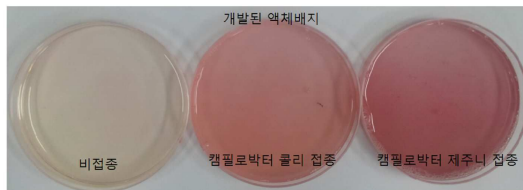
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **중균 단계에서 스크리닝이 가능한 캄필로박터 특이 크로모제닉 액체배지 및 그 제조방법**

(57) 요약

본 발명은 중균 단계에서 스크리닝이 가능한 캄필로박터 특이 크로모제닉 액체배지 및 그 제조방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2013-A423-0020
부처명	교육부(2)
연구관리전문기관	한국연구재단(과학재단)
연구사업명	기본연구지원사업(중견연구자-핵심연구)
연구과제명	[단독](2차)침단지능형 선택증균-컬러고체 배지와 단클론항체-은나노비드(MAb-IMB)를 활용한 식중독세균 캡필로박터 신속검출법 개발
기여율	1/2
주관기관	건국대학교 산학협력단
연구기간	2013.05.01 ~ 2014.04.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2013-A008-0021
부처명	농림축산식품부
연구관리전문기관	농림수산물기술기획평가원
연구사업명	수출전략기술개발
연구과제명	[단독](1차)유통 농산물의 위생 강화를 위한 수출형 식중독균 신속검사 기트 개발
기여율	1/2
주관기관	건국대학교 산학협력단
연구기간	2013.08.26 ~ 2014.08.25

명세서

청구범위

청구항 1

볼턴 브로스(Bolton broth)에 크로모제닉 브로스를 첨가하여 제조된 캄필로박터 특이적인 크로모제닉 액체 배지 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 크로모제닉 브로스는 알돌(Aldol) 515 아세테이트인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 알돌(Aldol) 515 아세테이트는 배지 1리터에 10-100mg포함되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 항생물질을 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 항생물질은 반코마이신(Vancomycin), 세포페라존(Cefoperazone), 트리메토프림(Trimethoprim) 및 사이클로헥시미드(Cycloheximide)인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 캄필로박터는 캄필로박터 제주니(Campylobacter jejuni) 또는 캄필로박터 콜리(Campylobacter coli)인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

증류수에 볼턴 브로스(Bolton broth) 및 크로모제닉 브로스를 첨가하여 혼합하는 단계를 포함하는 캄필로박터 특이적인 크로모제닉 액체 배지 조성물 제조방법.

청구항 8

제 6항에 있어서, 상기 크로모제닉 브로스는 알돌(Aldol) 515 아세테이트인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 알돌(Aldol) 515 아세테이트는 배지 1리터에 10-100mg포함되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 7항에 있어서, 상기 조성물은 항생물질을 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 8항에 있어서, 상기 항생물질은 반코마이신(Vancomycin), 세포페라존(Cefoperazone), 트리메토프림(Trimethoprim) 및 사이클로헥시미드(Cycloheximide)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 7항에 있어서, 상기 캄필로박터는 캄필로박터 제주니(Campylobacter jejuni) 또는 캄필로박터 콜리(Campylobacter coli)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 7항의 제조방법에 의하여 제조된 배지 조성물을 증균 단계의 배양 배지로 사용하여 증균 단계에서 색깔이 붉은 색으로 변한 증균 배지만 캄필로박터 오염 배지로 판정하는 단계를 포함하는 증균 단계에서 캄필로박터를 스크리닝(screening)하는 방법.

청구항 14

제 13항에 있어서, 상기 캄필로박터는 캄필로박터 제주니(Campylobacter jejuni) 또는 캄필로박터 콜리(Campylobacter coli)인 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 증균 단계에서 스크리닝이 가능한 캄필로박터 특이 크로모제닉 액체배지 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 캄필로박터(Campylobacter)로 인한 식중독 사고는 전세계적으로 발생되고 있으며, 특히 북미와 유럽 등의 선진국에서는 살모넬라(Salmonella)와 더불어 가장 문제시되고 있다. 식품(주로 계육) 내 캄필로박터 검출 시, 국내외 공인 검출법에서는 증균 후, 선택배양을 통해 검출을 실시하고 있다. 가장 널리 사용되는 선택배지는 mCCDA 배지(modified charcoal cefoperazone deoxycholate agar)라는 혈액이 함유되지 않은 선택배지로서, 활성탄, 피루브산 나트륨(sodium pyruvate), 세포페라존(cefoperazone) 등을 함유하여 사용하고 있다. 해당 선택배지는 FDA, ISO 등과 같은 국제적 검출기준에서 사용되고 있다.

[0003] 최근에는 다양한 종류의 캄필로박터 크롬 배지가 개발되어 식중독 세균을 간편하게 분리할 수 있도록 해준다.

[0004] 크롬배지라 함은 기질-효소 반응을 사용하여 검출하고자 하는 목적균만 특이적인 색깔로 나오게 하여 쉽게 균 집락구분이 가능하도록 개발된 배지이다.

[0005] 만약 증균 단계에서 균을 걸러낼 수 있다면 선택배양까지 가지 않아도 식중독균을 걸러 낼 수 있는데 이렇게 하면 시간이 절약되고, 음성을 금방 스크리닝 할 수 있어 노동력과 비용이 절감된다.

[0006] 관련 선행특허로 대한민국 특허공개번호 제1020090085202호는 캄필로박터균의 배양 또는 수송용 배지에 관한 것으로, (a) 캄필로박터균 성장 유지에 유효한 에너지원을 포함하는 영양 배지; (b) 혈액 또는 혈청; 및 (c) 젤라틴 성분을 포함하는 캄필로박터 균의 배양 또는 수송용 배지 조성물이 기재되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 증균 단계에서 균을 스크리닝할 수 있는 배지를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 증균 단계에서 균을 스크리닝할 수 있는 배지 제조방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 증균 단계에서 캄필로박터 균을 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 볼턴 브로스(Bolton broth)에 크로모제닉 브로스를 첨가하여 제조된 캄필로박터 특이적인 크로모제닉 액체 배지 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 크로모제닉 브로스는 알돌(Aldol) 515 아세테이트인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0012] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 조성물은 항생물질 보충물질을 더욱 포함하는 것이 바람직하고, 상기 항

생물질은 반코마이신(Vancomycin), 세포페라존(Cefoperazone), 트리메토프림(Trimethoprim) 및 사이클로헥시미드(Cycloheximide)인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0013] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 캄필로박터 균주는 캄필로박터 제주니(Campylobacter jejuni) 또는 캄필로박터 콜리(Campylobacter coli)인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0014] 또한 본 발명은 증류수에 볼턴 브로스(Bolton broth) 및 크로모제닉 브로스를 첨가하여 혼합하는 단계를 포함하는 캄필로박터 특이적인 크로모제닉 액체 배지 조성물 제조방법을 제공한다.

[0015] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 제조방법에 의하여 제조된 배지 조성물을 증균 단계의 배양 배지로 사용하는 방법을 제공한다.

[0016] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 제조방법에 의하여 제조된 배지 조성물을 증균 단계의 배양 배지로 사용하여 증균 단계에서 색깔이 붉은 색으로 변한 증균 배지만 캄필로박터 오염 배지로 판정하는 단계를 포함하는 증균 단계에서 캄필로박터를 스크리닝(screening)하는 방법을 제공한다.

[0017] 이하 본 발명을 설명한다.

[0018] Aldol 515 acetate는 크로모젠은 식중독을 일으키는 두 가지 균인 캄필로박터 제주니와 캄필로박터 콜리만 선택적으로 붉은 색으로 만드는 성질이 있다. 이를 일반 고체배지에 적용하여 선택배양 단계에서 콜로니 색으로 캄필로박터 균만을 선택적으로 분리하는 것이 가능하다.

[0019] 그러나 증균 단계에서 균을 걸러낼 수 있다면 선택배양까지 가지 않아도 식중독균을 걸러 낼 수 있는데 이렇게 하면 시간이 절약되고, 음성을 금방 스크리닝 할 수 있어 노동력과 비용이 절감된다. 일반적으로 식중독균의 배양 단계는 증균배양-선택배양-확인동정이다.

[0020] 본 발명자들은 Aldol 515 acetate는 크로모젠이 액체상태에서도 캄필로박터 균에 대해 특이적인 색을 나타내게 함으로서 캄필로박터 검출을 위한 크로모제닉 액체 배지 기술을 개발하였다.

[0021] 이하 본 발명을 설명한다.

[0022] 볼턴 브로스(Bolton broth)는 식품으로부터 캄필로박터(Campylobacter) 종에 대한 선택적인 증균 브로스(enrichment broth)이다(J.M. Hunt, Campylobacter, F.D.A Bacteriological Analytical Manual, 8th Edition, (Revision A) 7.01-7.27, AOAC, Arlington V A (1998) ;F.J. Bolton, Personal communication (1995)).

[0023] 이 배지는 캄필로박터(Campylobacter)의 회수(recovery)를 개량하기 위하여 특별하게 개발되었다(배지 제조방법 등 기타 사항은 OXOID 사 제품설명서 참조). 이 배지의 조성의 성분 및 용량(gm/litre)은 다음과 같다;미트 펩톤(Meat peptone) 10.0, 락토알부민 하이드로라이세이트(Lactalbumin hydrolysate) 5.0, 효모 추출물(Yeast Extract) 5.0, 염화 나트륨(Sodium chloride) 5.0, 알파-케토글루타르산(Alpha-ketoglutaric acid) 1.0, 염화 피루브산(Sodium pyruvate) 0.5, 염화 메타바이설파이트(Sodium metabisulphite) 0.5, 염화 카르보네이트(Sodium carbonate) 0.6, 헤민(Haemin) 0.01, pH는 7.4±0.2이었다.

[0024] 볼턴 브로스(Bolton Broth) 선택첨가제(Selective Supplement)에 포함된 하기 열거된 항생물질들은 캄필로박터(Campylobacter) 균주들에 대한 선택성을 최적화한다. 반코마이신(Vancomycin)는 그람-양성균(Gram-positives)에 활성을 가지며, 세포페라존(Cefoperazone)은 주로 그람-음성균(Gram-negatives)에 활성을 가지며, 트리메토프림(Trimethoprim)은 넓은 범위의 그람-음성균(Gram-negative) 및 그람-양성균(Gram-positive)에 대한 활성을 가지며, 사이클로헥시미드(Cycloheximide)는 효모에 활성을 가진다.

발명의 효과

[0025] 본 발명의 볼턴 브로스에 크로모제닉 브로스를 첨가하여 제조된 크로모제닉 액체 배지를 활용하면 증균단계에서 변색이 되는 증균배지만 캄필로박터 오염 배지로 의심하고, 다른 것들은 배제가 가능하므로, 음성 집락에 대해서는 추가적인 선택배양, 확인동정 등을 진행할 필요가 없어, 시간과 비용이 크게 절감되는 이점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 배양결과 비접종된 대조군과 달리 캄필로박터 콜리/제주니를 접종한 배지는 붉은 색으로 변화하는 것을 확인할 수 있는 그림.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 이하, 비한정적인 실시 예를 통하여 본 발명을 더욱 구체적으로 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 의도로 기재된 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.

[0028] 실시예 1: 캄필로박터 크로모제닉 배지의 제작

[0029] 기존에 가장 널리 사용되고 있는 볼턴 브로스의 성분에 크로모제닉 브로스를 넣어 발색이 되도록 하였다. 배지의 제조방법 등 기타 사항은 OXOID 사 제품설명서를 참조하여 제조하였다.

표 1

[0030]		구성성분
	용매	멸균 증류수 1L
	배지 구성물질	볼턴브로스 (옥소이드) 볼턴브로스용 항생제 supplement (옥소이드) - Aldol 515 acetate 10-100 mg (Biosynth)

[0031] 표 1은 캄필로박터 크로모제닉 배지의 조성

[0032] 실시예 2: 개발된 배지에서의 색변화 관찰

[0033] 20ml씩 페트리디쉬에 분주된 개발배지에, 캄필로박터 제주니 표준균주인 NCTC 11168 균과 캄필로박터 콜리 표준균주인 ATCC 33559 균을 접종한 후, 48시간에서 2일간 배양하였다. 비접종된 액체배지를 대조군으로 두었다.

[0034] 배양결과 비접종된 대조군과 달리 캄필로박터 콜리/제주니를 접종한 배지는 붉은 색으로 변화하는 것을 확인할 수 있었다(도 1).

[0035] 본 발명의 기술을 활용하면 증균단계에서 색깔이 붉은 색으로 변한 증균배지만 캄필로박터 오염 배지로 의심하고, 다른 것들은 배제가 가능하므로, 음성 집락에 대해서는 추가적인 선택배양, 확인동정 등을 진행할 필요가 없어, 시간과 비용이 크게 절약된다.

도면

도면1

