pISSN 1229-1153 *J. Fd Hyg. Safety*
Vol. 28, No. 3, pp. 252~257 (2013)
http://dx.doi.org/10.13103/JFHS.2013.28.3.252

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

황색포도상구균의 TEMPO STA와 표준 평판 배지를 이용한 정량분석법 비교

조용선* · 이다연 · 이주영 · 왕해진 · 신동빈
한국식품연구원 식품분석센터

Comparison of an Automated Technique TEMPO with Direct Plate Count Method for the Enumeration of *Staphylococcus aureus*

Yong Sun Cho*, Da-Yeon Lee, Joo-young Lee, Hae-Jin Wang, and Dong-Bin Shin
Food Analysis Center, Korea Food Research Institute, Gyeonggi-do 463-746, Korea
(Received April 3, 2013/Revised July 10, 2013/Accepted August 26, 2013)

ABSTRACT - In this study the automated technique TEMPO STA method, a new automated enumeration based on MPN method, was compared to the direct plate count method by testing various ready-to-eat compound food products. Artificially inoculated food samples with *Staphylococcus aureus* - Bibimbap, Bibimnaengmyeon, Mulnaengmyeon, Kimmaki, Salad, Japchae, and Sushi- were tested. Statistical analysis of the results showed above 99% in agreement between the two enumeration methods. Also, we monitored 466 various ready-to-eat compound food products samples. The measure uncertainties of the two methods is also familiar, while TEMPO STA automated method is simpler, less time-consuming, more effective and more stable.

Key words : *Staphylococcus aureus*, TEMPO STA, direct plate count method, ready-to eat compound

서 론

최근 핵가족화, 여성의 사회참여 확대 등으로 인해 식생활 양식이 변화하여 간편성, 편의성을 추구하는 소비 형태가 증가하였고 식품가공 기술, 포장기술이 발전하여 완전하게 조리된 상태로 판매되는 복합조리식품의 소비가 증가하고 있다[1,2,3]. 복합조리식품이란 샐러드와 같이 여러 가지 재료를 가열공정 없이 섭취하는 식품이나 비빔밥, 냉면 등 원·부재료를 가열 조리한 후 조리한 재료를 수작업의 후처리 과정을 통해 혼합하는 식품 또는 탕, 찌개 등 가열조리 후 후처리 과정이 없이 포장 판매하는 식품의 총칭을 말한다[4,5,6]. 이러한 복합조리식품은 소비자가 별도의 가열과정 없이 바로 섭취하여 위생관리를 소홀히 할 경우 식중독사고를 유발할 위험이 크기 때문에 위해 미생물 규격의 설정이 필수적이다[7,8,9]. 실제로 우리나라 식중독 발생 통계에 따르면 복합조리식품에 의해 많은 식중독 환자가 발생하며 원인물질이 판명된 것의 80~90%는 미생물에 의한 것으로 알려져 있어[8,9] 미생물에 의한 식중독 사고는 식품 안전에 있어서 가장 중점적으로 다루어져야 한다[5].

황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)은 식중독의 원인균으로 다른 세균에 비해 염에 대한 저항성이 강하여 0.5~16.5% 염 농도에도 증식하며, 산에도 강하여 pH 4.5~9.0 (최적pH 7.0~7.5) 범위에서도 증식하며 12~45°C(최적발육온도 30~37°C)에서도 발육하는 등 환경에 대한 적응력이 강하기 때문에[10] 자연계에 광범위하게 분포하고 있고 사람과 동물의 피부에도 상재하고 있어 식품에 오염될 가능성이 높아 식품 위생상 중요하게 다루어지고 있다. 황색포도상구균의 특징은 독소형 식중독 균으로 식품에서 증식하면서 대사 산물로 생산한 내독소(enterotoxin) 100 ng 정도를 경구 섭취 할 경우 인체에 영향을 미친다고 보고되어 있다[11,12]. 그러나 황색포도상구균은 균수가 5.0 log CFU/g이상일 때 독소를 생산하므로 균이 존재 하더라도 2.0 log CFU/g 이하인 경우 식중독 발생률이 낮을 것으로 판단되므로[5,13] 식품의 안전성의 척도를 확인하기에는 정성시험보다 정량시험이 효과적이다.

미생물의 정량 검출 시험법에는 표준 평판 배지법(direct plate count method), 정량 PCR법, 최확수법(most probable number), 건조 필름법 등이 있으며 식품 중의 황색포도상구균의 분석을 위해 국내 식품의약품안전청과 미국 FDA에서는 baird-parker한천배지를 선택배지로 하는 표준 평

*Correspondence to: Yong Sun Cho, Food Analysis Center, Korea Food Research Institute, Gyeonggi-do 463-746, Korea
Tel: 82-31-780-9242, Fax: 82-31-780-9280
E-mail: yscho@kfri.re.kr

판 배지법을 사용 하고 있다[14,15]. 그러나 baird-parker 한천 배지는 특이성이 낮아 다른 세균의 오염으로 인해 황색포도상구균의 집락수를 계수하기가 상당히 어렵고, 시험과정이 복잡하여 확인시험까지 시간과 노동력이 많이 소요되는 등의 문제점이 있다[16].

미생물 정량분석 TEMPO system은 액체 배지에 시료를 일정량 분주하고 배양하여 양성을 보이는 관의 개수로부터 최확수표를 이용하여 시료 100 g 중에 들어있는 미생물의 수를 확률적으로 구하는 방법으로 16 최확수법(most probable number)을 형광반응을 이용하여 분석하여 정확도를 높인 자동화 장비이다[17,18,19,20,21].

최근 식품의 안전성에 대한 소비자의 관심이 증가하면서 식중독균 검사를 해야 하는 식품의 품목이 증가되고 있으며 식품공전 및 국제 기준에도 정량기준이 강화되고 있는 추세이므로 빠르고 정확한 실험결과를 얻어야 하는 경우가 많아지고 있다. 그러므로 정량 분석 장비인 TEMPO system의 수요증가가 예상되므로[17,18,21] 이에 대비하여 식품의 안전성 평가에 사용되는 기존의 실험법의 비교 및 타당성 연구가 선행되어야 할 것으로 생각된다[20]. 따라서 본 연구에서는 정량 분석 장비인 TEMPO system을 국내 유통되는 복합조리식품에 적용해 보고, 표준 평판 배지법과의 상관관계와 유의성을 조사해 보았다.

재료 및 방법

시료

전국 대형 유통매장에서 판매하고 있는 복합조리식품 중 황색포도상구균 검출 빈도수가 높은 재료를 혼합한 식품인 비빔밥, 비빔냉면, 물냉면, 김마끼, 샐러드, 잡채, 초밥 총 7종을 구입하여 황색포도상구균 식품공전에 따라 정성시험을 하였다. 이 중에서 음성이 확인된 식품을 시료로 사용하였으며 모든 시료는 냉장 상태로 운송하여 4시간 이내에 실험하였다.

표준 균주

본 실험에 사용한 황색포도상구균ATCC 6538은 한국미생물 보존센터(KCCM, Seoul, Korea)에서 분양 받아 표준균주로 사용하였다

시료 전처리

시료 25 g에 225 mL의 멸균인산완충용액을 분주하고 황색포도상구균을 blank 0 CFU/g, low level 1~10 CFU/g, medium level1 10~100 CFU/g, medium level2 100~1000 CFU/g, high level 1000~10000 CFU/g 의 농도로 접종하여 stomacher(Seward, London, UK)에서 260 rpm으로 1분간 균질화 후 시험액으로 사용하였다.

표준 평판 배지법을 이용한 정량계수

시험액으로 10배 단계 희석액을 만든 다음 각 단계별 희석액을 baird-parker(BP; Merck, Darmstadt, Germany)한천배지 3매에 300 μL, 300 μL, 400 μL씩 총 접종양이 1 mL이 되게 도말하여 35ºC에서 48시간 배양 후 황색포도상구균의 전형적인 집락을 계수하였다.

계수한 평판에서 5개 이상의 전형적인 집락을 선별하여 baird-parker + rabbit plasma fibrinogen 배지(BP + RPF; bioMerieux, Marcy L'Etoile, France)에 획선 도말하고 35ºC에서 24시간 배양 하여 coagulase 유무를 확인하였다. Coagulase 양성인 집락은 VITEK 2(bioMerieux, Marcy L'Etoile, France)를 이용해 동정하고 확인 동정된 균수에 희석배수를 곱하여 계수하였다.

TEMPO STA 법을 이용한 정량계수

시험액으로 10배 단계 희석액을 만든 다음 각 단계별 희석액 1 mL와 멸균증류수 3 mL을 TEMPO STA media vial에 분주하고 TEMPO preparation station을 이용해 STA 카드에 희석한 균액을 주입한 후 35ºC에서 24시간 배양 후 TEMPO reading station으로 결과값을 얻었다.

통계 분석

각 시료당 3반복하고 결과값의 평균을 구해 CFU/g을 log unit으로 전환하여 평균 ± 표준편차로 나타내었다. 표준평판 배지법의 결과와 TEMPO STA법 결과간의 상관관계를 선형회귀분석 그래프로 나타내었다. 회귀직선으로부터 얻은 상관계수(r^2), 기울기(slope), 절편(intercept)으로부터 실험 군 간의 상관관계를 분석하였고 상관계수(r^2) 의 절대값이 0.9 이상이면 두 방법으로 측정한 값들 사이에 상관관계가 있는 것으로 인정하였다[20]. SPSS version12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 의 paired T-test를 통해 P-value를 구하고 $p < 0.05$신뢰도 구간으로 설정, 통계학적 유의성 유무를 판단하였다.

모니터링

실험 군이었던 비빔밥, 물냉면, 비빔냉면, 김마끼, 샐러드, 잡채, 초밥 의 7종 외에도 김밥, 볶음밥, 반찬, 돈까스, 토스트, 자장면, 크레페, 햄버거 등 전국 대형 유통매장에서 판매하고 있는 복합조리식품을 구입하여 466개 sample을 구입하여 TEMPO STA법을 적용해 보았다.

결과 및 고찰

표준 평판 배지법을 이용한 황색포도상구균의 정량과 자동화 기기인 TEMPO STA의 정량 수치를 비교하기 위해 결과값에 영향을 끼치는 인자가 많고 변수의 빈도가 높을 것으로 예상되는 복합조리 식품을 선택하였다. 시료는 전

국 대형 유통매장에서 판매하고 있는 비빔밥 (채소류, 육류, 곡류, 소스), 비빔냉면 (채소류, 육류, 면류, 계란), 물냉면 (채소류, 육류, 면류, 계란), 김마끼 (채소류, 곡류, 어패류), 샐러드 (채소류, 소스), 잡채 (채소류, 면류, 육류), 초밥 (곡류, 어패류)의 7종으로 이들 시료는 황색포도상구균의 검출 빈도수가 높은 곡류, 채소류, 육류, 어패류 등이 혼합된 식품으로 선택한 7종류의 복합조리 식품에 황색포도상구균을 인위적으로 접종 후 표준 평판 배지법과 TEMPO STA법으로 정량 분석하여 각 식품별로 두 검사법 간의 상관관계를 조사한 결과 비빔냉면과 잡채가 0.99로 가장 유사한 상관관계를 보였고 물냉면 > 비빔밥 = 김마끼 = 초밥 순으로 확인되었으며 이 중 샐러드가 0.96으로 가장 낮은 상관관계를 보였다. 하지만 모든 식품유형에서 0.9이상의 높은 상관계수(r^2)를 나타내어 표준 평판 배지법과 TEMPO STA법은 시료에 관계없이 두 방법간에는 높은 연관성을 보였다(Table 1). 이러한 결과로 한국의 다양한 식품 및 복합조리 식품에서 황색포도상구균의 정량 분석을 위해 TEMPO STA법을 이용해도 기존의 표준 평판 배지법과 동일한 결과를 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

Table 1. Result of different contamination levels test for various samples of the discrepancy between TEMPO® and direct plate count method

Foods	Inculate Level[1)]	Result of TEMPO®[2)]	Direct plate count method[2)]	Coefficient (r^2)
Bibimbap	Low	1.50 ± 0.44	1.00 ± 0.00	0.97
	Medium1	2.43 ± 0.32	2.17 ± 0.35	
	Medium2	3.37 ± 0.06	3.17 ± 0.25	
	High	4.30 ± 0.10	4.27 ± 0.12	
Bibimnaeng-myeon	Low	1.27 ± 0.46	1.17 ± 0.29	0.99
	Medium1	2.10 ± 0.00	2.23 ± 0.23	
	Medium2	3.33 ± 0.25	3.37 ± 0.06	
	High	4.23 ± 0.15	4.20 ± 0.00	
Mulnaeng-myeon	Low	1.23 ± 0.21	1.10 ± 0.17	0.98
	Medium1	2.43 ± 0.15	2.10 ± 0.17	
	Medium2	3.27 ± 0.15	3.13 ± 0.12	
	High	4.17 ± 0.15	4.27 ± 0.45	
Kimmaki	Low	1.30 ± 0.79	1.27 ± 0.25	0.97
	Medium1	2.53 ± 0.40	2.17 ± 0.21	
	Medium2	3.50 ± 0.40	3.27 ± 0.35	
	High	4.53 ± 0.25	4.33 ± 0.32	
Salad	Low	1.83 ± 0.29	1.47 ± 0.40	0.96
	Medium1	2.70 ± 0.17	2.07 ± 0.40	
	Medium2	3.37 ± 0.23	3.43 ± 0.23	
	High	4.30 ± 0.35	4.43 ± 0.12	
Japchae	Low	1.33 ± 0.32	1.10 ± 0.17	0.99
	Medium1	2.57 ± 0.42	2.30 ± 0.20	
	Medium2	3.50 ± 0.20	3.40 ± 0.26	
	High	4.40 ± 0.30	4.47 ± 0.21	
Sushi	Low	1.33 ± 0.42	1.37 ± 0.40	0.97
	Medium1	2.27 ± 0.15	2.03 ± 0.12	
	Medium2	3.20 ± 0.20	3.50 ± 0.36	
	High	4.07 ± 0.06	4.17 ± 0.47	

*Numerical data which can be transformed in logarithmic form.
[1)]Low level sample inoculated 1~10 CFU/g, Medium1 level sample inoculated 10~100 CFU/g, Medium1 level sample inoculated 100~1000 CFU/g, High level sample inoculated 1000~10000 CFU/g
[2)]Mean ± SD (log CFU/g)

동일한 시료에 대한 TEMPO STA법과 표준 평판 배지법으로 정량한 결과값의 차를 계산한 결과 비빔밥 –0.25, 김마끼 –0.21, 샐러드 –0.20, 잡채 –0.13, 물냉면 –0.13, 비빔냉면 0.01, 초밥 0.05로 비빔밥, 김마끼, 샐러드, 잡채, 물냉면은 표준 평판 배지법을 이용한 정량 결과 값이 TEMPO STA 비용보다 균이 더 많이 검출되었고, 비빔냉면과 초밥은 TEMPO STA법으로 정량한 값이 균이 많이 검출되었는데 이는 실험 과정에서 생기는 오차나 food matrix 때문에 두 결과값이 차이가 난다고 생각된다(Fig. 1).

최종적으로 분석한 시료에 대해 정량 분석한 실험에서 얻은 결과값을 표준 평판 배지법과 TEMPO STA법 간의 상관관계 분석을 하였더니 기울기(slope) = 1.040, 절편(intercept) = –0.2383, 상관계수(r^2) = 0.9672로 두 실험간에는 높은 연관성을 보였다. 또한 paired T-test 결과 t = –3.122, DF = 54, $p = 0.003$, 즉 신뢰구간 99.7%로 두 실험방법간에는 유의적 차이가 없었다($p < 0.05$) (Fig. 2).

TEMPO STA법을 466개의 다양한 시료에 대해 적용 모니터링 한 결과 TEMPO STA와 표준 평판 배지법의 결과는 Table 2 와 같다. 황색포도상구균의 정량기준인 100 CFU/g 이상인 시료는 5개(2.6%)로 TEMPO STA와 표준 평판 배지법의 실험결과가 일치하였고 100 CFU/g 이하인 454개(97.4%)의 시료 중 12개(2.6%)의 시료에서는 error가 발생하였다. TEMPO STA에서 발견된 error는 주로 insufficient volume in the card or strongly colored sample(시험액 용량이 충분치 않거나 시료의 색이 강하다)나 card results interpretation leads to incoherent result(카드의 결과 해석

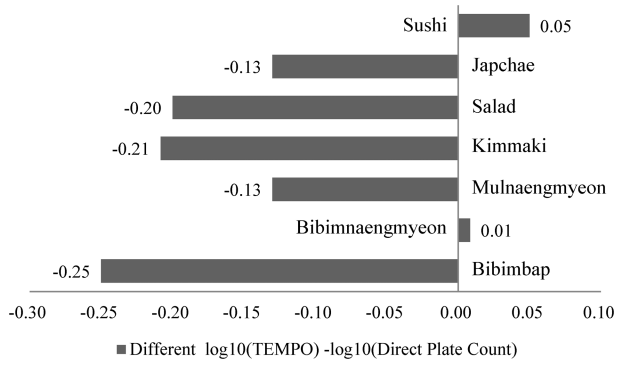

Fig. 1. Difference in the means (TEMPO-Direct Plate Count) of experiment.

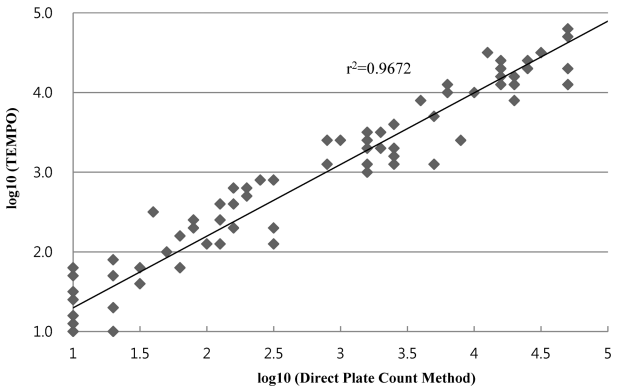

Fig. 2. Linear regression of $\log_{10}$ (Direct Plate Method) vs $\log_{10}$ (TEMPO) in artificially contaminated 7 species samples.

Table 2. Agreement between TEMPO and Direct Plate Count Methods

Range	Total number	Discrepancies	Agreement[1)]
With range[2)]	461	12(2.60%)	449(97.40%)
Above range[3)]	5	0(0.00%)	5(100%)
Total	466	12(2.58%)	454(97.42%)

[1)]Less than one log between both methods
[2)]Numerical data which can be transformed in log 10 for both methods
[3)]Data for which at least one of the two methods gives results "more than"

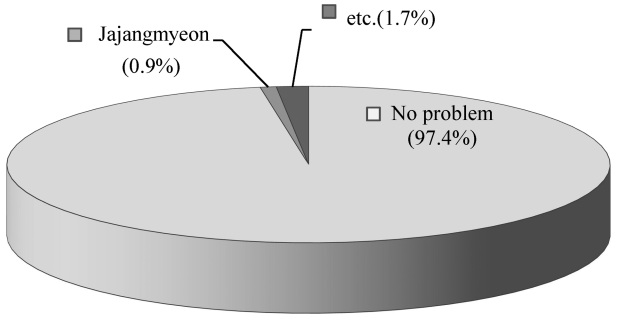

Fig. 3. Error samples in TEMPO 466 samples.

이 비논리적이다)였다. Error 시료는 야채김밥, 피자핫도그, 크레페, 돈까스버거, 탕수육, 김마끼, 모듬 나물, 열무비빔밥 총 8가지 식품이 각 1회의 error가 발생하였다(Fig. 3). Error 시료 중 자장면은 총 16개의 시료 중에 4개(25%)에서 error가 발생하였다. 이러한 결과를 보면 자장면을 TEMPO STA를 이용한 정량법을 적용하기는 부적합하다고 생각된다. 이러한 이유는 TEMPO법은 TEMPO card에서 미생물이 배양되면서 생성되는 효소에 의해 발현하는 형광물질을 측정하는 원리로 형광물질을 가리는 인자가 있을 때 결과값에 문제가 될 수 있어[20,22], 강한 색상을 가지거나 혼탁한 시료를 분석 시 주의 하여야 하는데 자장면이 가지는 검정색 소스로 인해 형광물질 측정을 방해하여 결과값에

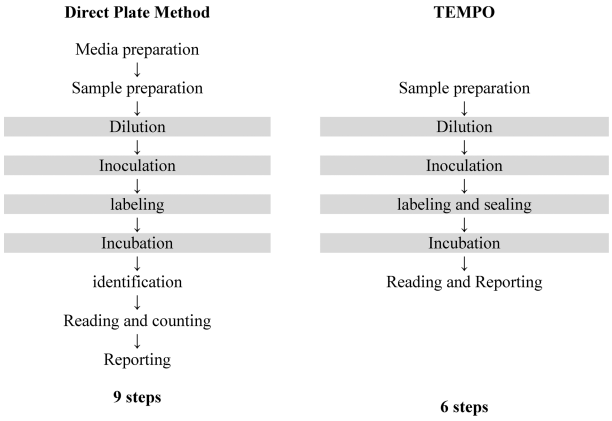

Fig. 4. Outline of experiment.

error가 발생한 것으로 유추된다. 또한 같은 식품 종류라 하더라도 일부 시료에만 error가 발생한 이유는 식품마다 들어간 원재료의 양이나 성상, 저해 세균 등 food matrix에 의해 발생했을 것이라 예상된다. 하지만 황색포도상구균 정량법을 비교한 결과 97.4%에서 유의적 결과를 얻을 수 있어 TEMPO STA를 이용하여 정량 분석을 하는 것은 문제가 없을 것으로 생각된다. TEMPO는 결과값 표기 시 음성이거나 균수가 10 CFU/g 이하인 경우 결과값이 정확한 균수로 표시되지 않고 10미만(< 10 CFU/g)으로 표시된다[21,22]. 그러므로 식품공전에서 규정한 기준 규격이 100 CFU/g 이하인 제품은 TEMPO system을 이용한 모니터링이 가능하나 크림빵 류와 같이 기준이 음성인 식품에 대해서는 적용이 불가능하다. 그러나 황색포도상구균은 독소형 세균으로 점차적으로 규격이 정량화되고 있으므로 향후 TEMPO STA를 이용한 정량 분석 방법의 사용은 증가 할 것으로 생각된다.

TEMPO system은 최확수법을 자동화 시킨 방법으로서 16개의 tube (1.0 MPN/g)를 사용해 3개의 tube (3.0 MPN/g) 또는 5개의 tube (1.8 MPN/g)를 사용하는 기존의 MPN 방법보다 test수가 많아 검출할 수 있는 최소량(limit of detection)이 낮아 측정치의 변동이 정규분포에 가까워지므로 이론상 가장 근접한 수치를 얻게 된다고 알려져 있으므로[17,18,19,23] 정확한 정량검출이 가능할 것이라 생각된다. 또한 표준 평판 배지법에 비해 TEMPO법은 실험과정이 간단하여(Fig. 4) 간편하고 사용이 쉬우며 신속한 결과를 얻을 수 있으며 자동화된 장비로 실험과정에 의한 오류를 최소화 할 수 있는 장점이 있다[17,18,20,21,22].

최근 식품의 안전성 확보를 위해 검사 품목이 다양해지며 검사 수나 종류 등이 증가하는 추세이므로 황색포도상구균의 정량검사가 정확하고 신속해야 할 필요가 있다[21]. 또한 정성이 아닌 정량 값을 요구하는 규격으로 변화하고 있으므로 TEMPO system을 이용한 자동화 분석 방법의 필요성은 앞으로 크게 늘어날 것으로 보인다. 현재 TEMPO system을 이용해 일반세균수(TVC)를 정량하는 분석방법은

AOAC에서 2002년 승인 받은 이래 미국이나 유럽 등에서는 활발하게 쓰이고 있으며[19] 그 외 황색포도상구균(STA), 대장균(EC), 대장균군(CC)의 방법에 대한 인증도 꾸준하게 진행되고 있으며 다양한 미생물을 정량 할 수 있는 TEMPO kit도 개발되고 있다.

그러므로 TEMPO STA를 이용한 정량 분석법을 적용을 위해 자장면과 같이 고유의 색이 강한 식품이나 식품자체의 저해세균 등의 food matrix에 의해 검출법의 민감도가 달라질 수 있는 식품이나[17,18] coagulase 양성 및 음성인 황색포도상구균이 섞여있을 때의 경우를 고려한 비교 분석을 추후 검증 할 필요성이 있다.

요 약

표준 평판배지 정량검출법과 TEMPO STA를 이용한 황색포도상구균 정량 분석에 대한 상관성과 유의성을 평가하기 위해 복합조리식품에 황색포도상구균을 인위적으로 접종하여 결과값을 통계 처리하여 유의성을 조사한 결과 두 실험방법간에는 유의적 차이가 없었다($p < 0.05$). 상관계수(r^2)는 0.9672로 두 실험간에는 높은 연관성을 보였다. TEMPO STA를 466개의 시료에 적용한 결과 454개(97.4%)의 시료는 문제가 없었으나 이중 12개의 시료에서는 error가 발생하였다. 그러나 TEMPO법은 실험 단계 간편하고 사용이 쉬우며 신속한 결과를 얻을 수 있으며 자동화된 장비로 실험 과정에 의한 오류를 최소화 할 수 있는 장점이 있으며 표준시험법인 표준 평판 배지법과도 유의적인 차이가 없어 정확한 정량검출이 가능할 것으로 생각된다. 최근 식품의 안전성확보를 위해 검사 품목이 다양해지며 수도 증가하는 추세이기 때문에 황색포도상구균의 정량 검사가 정확하고 신속해야 할 필요가 있으므로 TEMPO STA법의 필요성은 앞으로 크게 늘어날 것으로 보인다.

참고문헌

1. Choi, S.K., Lee, M.S., Lee, K.H., Lim, D.S., Lee, K.H., Choi, K.H., Kim, C.H.: Changes in quality of hamburger and sandwich during storage under simulated temperature and time, *Korean J. Food Sci. Ani. Resour,* **18(1)**, 27-34 (1998).
2. Moon, J.Y., Lee, E.J., Kim, Y.B.: Rapid detection of methicilin resistant *Staphylococcus aureus* by multiplex PCR, *J. Bacteriol. Virol,* **34(2)**, 91-10 (2004).
3. Kim, J.Y., Kwon, K.I., Ha, S.Y., Hong, C.H.: Changed of contamination level of *Listeria* spp. during the processing environment in kimbab restaurants, *J. Food Hyg. Saf*, **20(4)**, 232-236 (2005).
4. Park, J.H., Park, D.W., Kim, J.S.: Microbiological Risk Management of Manufactory Process for Ready-to-eat Compound Food, *J. Food Science and Industry*, **36(2)**, 4-17 (2003).
5. Bean, N.H., Goulding, J.S., Lao, C., Angulo, F.J.: Surveillance for foodborne disease outbreaks-United States, 1988-1992, *Mob Mortal W Rep,* **45(5)**, 1-66 (1996).
6. Kim, B.R., Chae, S.J.: Microbiological Quality Assessment of Bibimbap Production Flow in Elementary School Foodservice, *J. the Korean Home Economics Association,* **43(2)**, 19-31 (2005).
7. Kwock, C.K., Jang, J.K.: The Promotion Strategies of Well-being Food Industry, *J. Food Industry and Nutrition*, **13(1)**, 17-27 (2008).
8. 식품의약품안전처 : 정량적 위해평가를 통한 식품으로부터 고위해 식중독균의 Risk Profile 및 위해관리 연구보고서, (2008).
9. 식품의약품안전처. 식중독 발생현황통계, from: http://www.kfda.go.kr/e-stat/index.do (2012).
10. Buchanan, R.L., Smith, J.L., Mccolgan, C., Marmer, B.S., Golden, M., Dell, B.: Response surface models for the effects of temperature, pH, sodium chloride, and sodium nitrate on the aerobic and anaerobic growth of *staphylococcus aureus* 196E, **13,** 159-175 (1993).
11. Balaban, N., Rasooly, A.: Staphylococcal enterotoxins, *Int J. Food Microbiol*, **61(1)**, 1-10 (2000).
12. Kim, E.J., Choi, J.H., Kwak, T.K.: Analysis of Microbiological Hazards to Determine *S. aureus* Contamination Levels at School Foodservice Operations in Gyeonggi Province, *Koean J. Food Cookery sci*, **25(3)**, 365-378 (2009).
13. Min, K.J., Hwang, I.G., Lee S.H., Cho, J.I., Yoon, K.S.: Determination of Risk Ranking of Combination of Potentially Hazardous Foods and Foodborne Pathogens Using a Risk Ranger, *J. Fd Hyg. Safety*, **26(2)**, 91-99 (2011).
14. Lee, J.H., Song, K.Y., Hyeon, J.Y., Hwang, I.G., Kwak, H.S., Han, J.A., Chung, Y.H., Seo, K.H.: Comparison of Standard Culture Method and Real-time PCR Assay for Detection of *Staphylococcus aureus* in Processed and Unprocessed Foods, *Korean J. Food Sci. Ani. Resour*, **30(3)**, 410-418 (2010).
15. U.S. Food and Drug Administration. BAM. Chap 12. *Staphylococcus aureus*, from: http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071429.htm.
16. Palomares, C., Torres, M.J., Torres, A., Aznar, J., Palomares, J.C., Rapid detection and identification of *Staphylococcus aureus* from blood culture specimens using real-time fluorescence PCR. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*, **45**, 183-189 (2003).
17. Owen, M., Willis, C., Lamph, D.: Evaluation of the TEMPO most probable number technique for the enumeration of Enterobacteriaceae in food and dairy products, *Journal of Applied Microbiology*, **109**, 1810-1816 (2010).
18. Torlak, E., Akan, I.M., Gokmen, M.: Comparison of TEMPO EC and TBX medium for the enumeration of *Escherichia coli* in cheese, *Letters in Applied Microbiology*, **47**, 566-570 (2008).
19. Official Methods of Analytical Online 18th Ed., AOAC INTERNATIONAL Automated Enumeration of Total Viable Count in Food, TEMPO® TVC Method. from http://www.eoma. aoac.org/methods, (2009).
20. Kim, Y.J., Wee, S.H., Yoon, H.C., Heo, E.J., Park, H.J., Kim,

J.H., Moon, J.S.: Comparison of an Automated Most-Probable-Number Technique TEMPO®TVC with Traditional Plating Methods Petrifilm for Estimating Populations of Total Aerobic Bacteria with Livestock Products, *J. Fd Hyg. Safety*, **27(1)**, 103-107 (2012).

21. Song, K.Y., Chon, J.W., Kim, H.S., Kim, Y.G., Kim, D.H., Sung, C.H., Hyeon, J.Y., Park, J.H., Lee, J.I., Seo, K.H.: Evaluation of the Automated TEMPO technique for the enumeration of *Staphylococcus aureus* in various ready-to-eat food products, *Kor. J. Vet. Hlth*, **5(4)**, 295-298 (2011).
22. TEMPO® from: http://www.biomerieux.com/en/tempo.
23. Zitz, U., Domig, K. J., Hoehl A., Weiss H., Wilrich, P-Th., Kneifel, W.: Evaluation of three applications of a semi-automated most-probable-number method for the assessment of microbiological parameters in dairy products, *Accred Qual Assur*, **16**, 299-309 (2011).