pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 40, No. 6, pp. 403~413 (2025)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2025.40.6.403

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

일반세균 검출을 위한 Petricore™ 건조필름배지의 유효성 평가

성원기[1] · 최유리[2] · 오세욱[2]*
[1](주)피앤지바이오메드, [2]국민대학교 식품영양학과

Evaluation of Petricore™ Dry Film Media Efficacy for Total Aerobic Bacterial Detection

Won-Ki Sung[1], Yu-Ri Choi[2], Se-Wook Oh[2]*
[1]*PNG BIOMED Co., Ltd., Yongin, Korea*
[2]*Department of Food and Nutrition, Kookmin University, Seoul, Korea*

(Received Septmeber 9, 2025/Revised October 23, 2025/Accepted October 23, 2025)

ABSTRACT - Petricore™ is a pre-sterilized dry, rehydratable film medium used for the enumeration of aerobic and facultatively anaerobic bacteria. According to the ISO 11133 guidelines, five reference strains (i.e., *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 8739, *S. aureus* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 6538, and *B. subtilis* ATCC 6633) were selected, and the media performance test for these strains was conducted and compared with the standard plate agar method. A paired validation study was conducted to compare Petricore™ culturing method with plate count agar (PCA) culturing method used in the U.S. reference method (FDA BAM Chapter 3: Aerobic count plate), across 13 different food matrices (2 meats, 3 fishes, 3 vegetables, 5 processed foods). Five replicates at three contamination levels were used for each matrix. The mean difference, standard deviation of the repeatability (S_r), linear correlation coefficient (R^2), relative standard deviation (RSD), and productivity ratio (P_r) were calculated. Statistical analysis was performed using a paired t-test (P>0.05). In the media performance test using reference strains, Petricore™ obtained a productivity ratio of ≥0.70 for all reference bacterial strains. No significant differences (P>0.05) were observed in the aerobic bacterial numbers. For the comparative study using food matrices, two methods exhibited high correlations of >0.90 and yielded a mean difference within the acceptable range of ±0.50 in all 13 food samples. The standard deviation of Petricore™ repeatability was 0.01-0.14, being comparable to the PCA values of 0.02-0.12. For all food matrices, Petricore™ demonstrated precision with a RSD of ≤3%. In the nested one-way ANOVA test, significant differences (P<0.05) were observed for certain samples. This study demonstrated that Petricore™ could serve as a reliable alternative to the conventional plate method for the microbiological analysis of various food matrices.

Key words: Petricore™, Dry film media, Total aerobic bacteria, Effectiveness, Evaluation

식품 중에 존재하는 미생물의 확인시험은 식품의 품질과 안전성 평가에 중요한 역할을 한다. 이를 위해 사용되는 일반세균 측정법으로는 표준 평판법, 건조필름법 또는 자동화된 최확수법(automated MPN)이 표준 시험법으로 사용되고 있다[1]. 일반세균수 이외에도 주요 지표균을 확인하기 위한 검출 시험법으로는 표준 평판법 외에 다양한 변형된 형태의 특정균을 구별하는 선택 및 발색배지, 확인 시험을 위한 생화학적 확인시험법 및 응집시험법, 사용성을 개선한 spiral plate법이 있다[2]. 또한, 효소 결합 면역 흡착 분석법(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)를 포함한 면역분석법도 사용된다[2].

일반세균은 유기물을 분해하여 탄소와 에너지를 얻는 호기성 및 통성 혐기성 세균을 총칭한다. 이러한 세균의 생육은 배지의 조성, 배양 시간 및 온도 등 다양한 요인에 영향을 받으며, 식품공전에서 명시된 배지와 표준 시험법을 통해 세균 수를 측정한다[3]. 또한, 미생물 시험은 식품공전에서 24가지 식품별로 해당 품목에 따라 규격이 고시

*Correspondence to: Se-Wook Oh, Department of Food and Nutrition, Kookmin University, Seoul 02727, Korea
Tel.: +82-2-910-5778; Fax: +82-2-910-5249.
E-mail address: swoh@kookmin.ac.kr

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

되어 있다[3]. 이 중 일반세균 시험은 전체 식품 검사 중 67%를 차지하며, 가장 기본적으로 시험하는 항목이다[3]. 식품산업에서 일반세균 시험은 다양한 측면에서 중요하다. 1) 식품의 유통기한을 설정 및 조정의 중요한 지표가 된다. 일정 수준 이상의 일반세균이 검출되면 부패될 가능성이 높아지므로, 이를 통해 적절한 유통기한을 설정할 수 있다. 2) 해당 식품 또는 투입 원료에 대한 일반세균 시험은 생산 공정의 일관성과 완제품의 품질관리를 위한 지표가 된다. 3) 일반세균 시험은 정부의 법적 규제 대상이므로 엄격히 시행하고 관련 서류를 보관하여야 한다. 이는 제품의 품질 문제 발생시 정부의 추적성을 보장할 수 있다. 4) 일반세균 시험은 식품의 제조, 가공, 보관 및 유통 과정의 위생 상태를 평가하는 지표가 된다. 이를 통해 제조 공정 및 환경을 지속적으로 개선하여 식품의 안전성을 확보할 수 있다. 5) 일반세균 시험으로 제품의 품질관리를 통해 소비자에게 제품의 신뢰를 확보할 수 있다[4-6].

표준 평판법이 전통적으로 이용되고 있으나, 표준한천배지를 조제하기 위해서는 많은 시간과 노력이 소모된다는 단점이 있다[7]. 또한, 표준 평판법은 지시제가 없어 측정상의 어려움이 있으며, 전기와 물의 소모, 폐기물의 증가, 탄소배출 등 환경적 요구를 충족시키기 어려운 문제점이 있다[8]. 식품공전 상에 등재된 건조필름법은 앞에서 언급된 단점과 환경문제를 극복할 수 있는 대체 시험법으로, 그 사용이 지속적으로 증가할 것으로 예상된다.

건조필름배지는 미생물의 증식이 가능한 영양성분을 필름에 코팅하여 건조한 것으로, 시료를 접종하면 수분을 흡수하여 한천배지와 유사한 겔을 형성함으로써 미생물이 증식할 수 있도록 제조된 배지이다[9]. 이는 조작이 간단하고 일반세균, 대장균군 및 대장균의 검출이 가능하며, 차지하는 부피가 적어 다량의 시료를 처리할 수 있다. 또한, 지시약이 혼합되어 있어 검출이 용이하다는 등의 장점을 가지고 있어, 외국에서는 미생물 실험용 배지로 널리 사용되고 있다[9]. 또한 ISO 11133 가이드라인의 품질관리 기준에 따라 표준화된 공정에서 생산되므로, 실험자가 직접 배지를 제조하는 표준 평판법에서 발생 가능한 실험자 간 또는 실험실 간의 오차를 방지해 준다[2].

현재 시판되고 있는 건조필름배지 중 제일 먼저 개발된 제품은 3M 페트리필름으로, 1984년에 일반세균용 배지가 개발되어 출시되었다[10]. 이후 페트리필름과 같은 건조필름배지가 여러 종류 개발되고 출시되었는데, 구조는 조금 다른 형태를 갖고 있다. 식품공전 상에 등재되어 있는 건조필름배지의 경우, 53) 세균수 건조필름배지 I, 54) 대장균군 건조필름배지 I, 55) 대장균 건조필름배지 I, 69) 세균수 건조필름배지 II, 70) 대장균군 건조필름배지 II, 71) 대장균 건조필름배지 II로 총 6종이 있다[1].

본 연구에서는 식품공전 상의 건조필름배지 조성을 기반으로 배지의 구조를 개선하여 개발한 Petricore™가 전통적 미생물 검출법을 대체할 수 있는지 여부를 확인하고자 한다. 사용된 Petricore™의 품질 성능평가는 ISO 11133 지침서[11]에 따라 5종의 표준균주를 대상으로 정량 실험 및 평가를 진행하였으며, 시험법 간의 동등성 평가는 13종의 식품 샘플을 대상으로 미국 식품의약국(U.S. Food and Drug Administration, FDA)의 Bacteriological Analytical Manual (BAM) 제3장[12]에 기술된 표준평판배지(plate count agar, PCA)와 비교 시험을 통해 유효성을 검증하고자 하였다.

Materials and Methods

배지 및 시약

실험에 사용된 건조필름배지는 ISO 11133[11] 기준으로 생산 및 관리되고 있는 PNGBIOMED (Yongin, Korea)사의 Petricore™ 제품이 사용되었으며, 건조필름배지의 조성은 다음과 같다. Pancreatic digest of casein (Difco™, Franklin Lakes, NJ, USA) 3.4 g, yeast extract (Difco™) 2.4 g, sodium pyruvate (Difco™) 6.8 g, dextrose (Difco™) 0.6 g, dipotassium phosphate (KH_2PO_4, Difco™) 1.3 g, monopotassium phosphate (KH_2PO_4, Difco™) 0.4 g, guar gum (Duksan Chemical, Ansan, Korea) 91.4 g, 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC, TCI, Tokyo, Japan) 0.0205 g. Petricore™의 구조도는 Fig. 1과 같다.

그 외, 실험에 사용된 brain heart infusion broth (BHI), tryptic soy broth (TSB), PCA, violet red bile agar (VRBA), tryptic soy agar (TSA)는 Difco™사 제품을 사용하였다. Butterfield's phosphate-buffered diluent (BPD)는 FDA의 bacteriological analytical manual[12]을 따라서 제조하였다. 증류수 500 mL에 인산이수소칼륨(KH_2PO_4) 34 g을 용해하고 1 N 수산화나트륨(NaOH)를 사용하여 pH를 7.2로

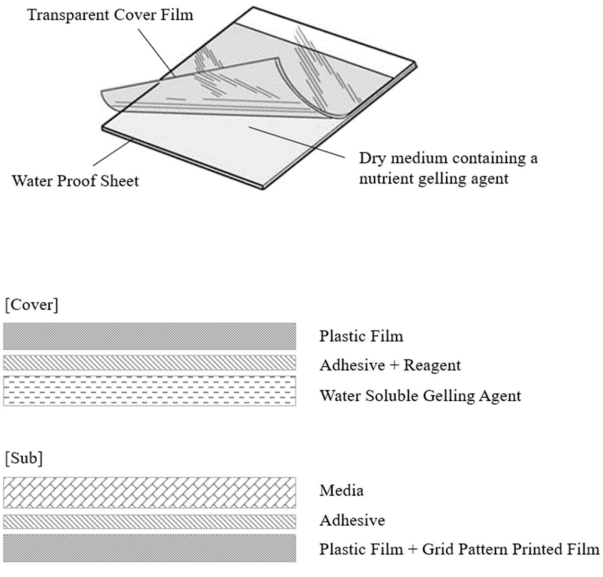

Fig. 1. Structure of Petricore™.

조정하였다. 여기에 인산완충용액 1.25 mL를 취하여 멸균 증류수 1,000 mL에 희석하여 사용하였다.

사용 균주

본 시험에 사용한 균주는 ISO 11133 지침서[11]에 제시된 방법을 차용하여 *E. coli* ATCC 25922, 8739, *S. aureus* ATCC 25923, 6538, *B. subtilis* ATCC 6633으로 선정하였으며, American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 분양받아 사용하였다. 25%(v/v) glycerol과 함께 -70°C에서 보존하던 균주를 액체 배지에 37°C에서 19-21시간 활성화한 후, 정지상의 초기 부분까지 2차 배양하여 균주를 준비하였다. 배양을 위해 사용한 액체배지는 각 균주에 따라 상이하였는데, *E. coli* ATCC 25922, 8739는 TSB에, *S. aureus* ATCC 25923, 6538, *B. subtilis* ATCC 6633은 BHI에 각각 2차 배양하여 실험에 사용하였다.

식품 시료의 전처리

총 13가지의 식품으로 간 돼지고기, 베이컨, 생연어, 참치, 생새우, 시금치, 양상추, 버섯, 샌드위치, 아이스크림, 냉동피자, 멸균우유, 어육소세지를 시료로 선정하였다. 모든 시료는 2024년 1월에서 2월 사이에, 지역 대형마트에서 구매하였다. 각 식품시료는 AOAC 가이드라인[13]에 따라 시료를 처리하였다. 이 중 간 돼지고기, 베이컨, 생연어, 참치, 생새우, 시금치, 양상추, 버섯, 샌드위치, 아이스크림, 냉동피자는 자연 오염되었으며, 오염 수준을 3가지로 나눈 뒤 실험을 진행하였다. 37°C에서 18-20시간 동안 보관된 시료를 높은 수준으로 지정하였으며, 낮은 수준은 각 식품 별 보관 방법에 따라 18-20시간 동안 보관하였다. 중간 수준은 높은 수준과 낮은 수준의 시료를 각각 1:10 비율로 혼합하여 오염 수준을 조정하였다. 자연오염이 완료된 샘플 50 g은 BPD 450 mL에 희석하여 1분간 균질화(Bag Mixer 400, Interscience, Saint Nom, France)하여 샘플 전처리를 완료하였다(Fig. 2).

멸균우유와 어육소세지는 초기 오염도가 낮아 균주를 인위접종하여 진행하였다. ISO 16140-2에 기술된 방법[14]에 의거하여 식품 시료에 스파이킹 하기 전 배양된 *E. coli* ATCC 8739를 50±0.5°C 항온 수조에서 10분간 방치하여 열 스트레스를 가하였다. 이후 *E. coli* ATCC 8739를 선택배지인 VRBA와 비선택배지인 TSA에 접종하여 손상율을 계산하였다. *E. coli* ATCC 8739가 10^1, 10^2, 10^3 CFU/mL이 되도록 희석한 후 서로 다른 농도의 *E. coli* ATCC 8739 균액 110 µL를 각각 멸균우유 11 mL에 첨가하였으며, 250 µL를 어육소세지 25 g에 첨가하였다. *E. coli* ATCC 8739가 시료 내에서 잘 성장할 수 있도록 멸균우유는 4°C에서, 어육소세지는 상온에서 48시간 동안 보관하였다. 이후, 멸균우유와 어육소세지를 각각 99 mL와 225 mL의 멸균 BPD에 첨가한 후 1분간 균질화 하였다(Fig. 3).

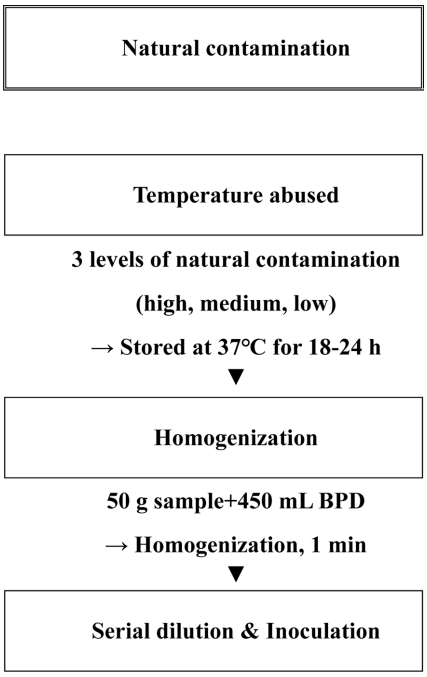

Fig. 2. Sample preparation for naturally contaminated food matrices.

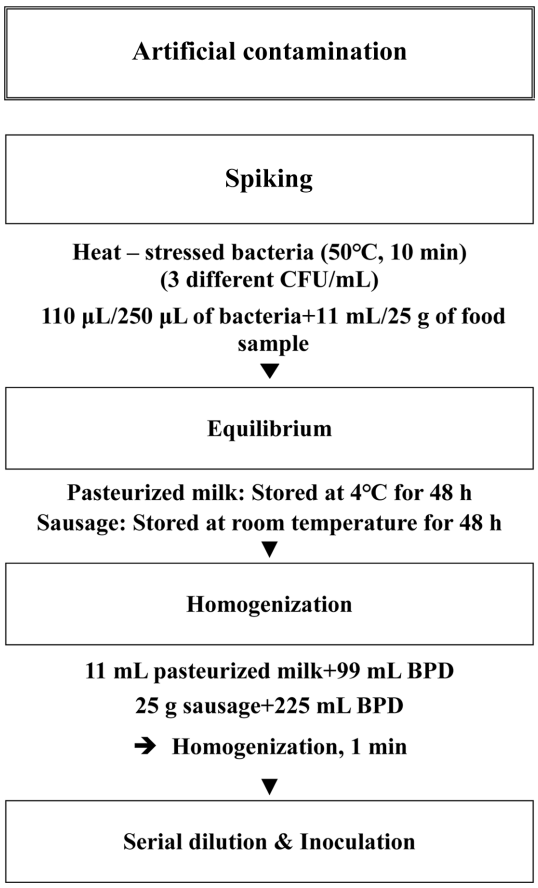

Fig. 3. Sample preparation of artificially contaminated food matrices.

건조필름배지(Petricore™) 배양법

전처리가 완료된 균주 및 식품시료를 십진 희석하여 각 희석액 1 mL를 Petricore™ 중앙에 접종한 후 누름판으로 눌러 37°C에서 48시간 배양하였다. 크기에 상관없이 모든 붉은색 집락을 계수하며, 유효 범위는 30-300이다. 한 시트 당 집락의 수가 300 초과일 경우 too numerous to count (TNTC)로 표기하며, 30 미만일 경우 too few to count (TFTC)로 표기한다. 이때, 추정치가 필요한 경우 1×1 cm 이내의 집락을 계수하고 20을 곱해 추정치를 계산할 수 있다.

Plate count agar (PCA) 배양법

전처리가 완료된 균주 및 식품 시료를 십진 희석하여 각 희석액 1 mL를 페트리접시에 접종한 후, 45°C 액체상태의 PCA를 무균적으로 분주하고 페트리접시 뚜껑에 부착하지 않도록 주의하면서 회전하고, 좌우로 기울이면서 검체와 배지(15-18 mL)를 잘 혼합하여 응고시켰다. 추가로 집락의 확산 방지를 위해 굳은 페트리접시에 약 2 mL를 가하여 중첩시켰다. 완전히 굳은 후, 배지는 뒤집어서 37°C에서 48시간 배양하였다. 15-300개의 집락을 생성한 PCA를 택하여 집락수를 계산하였다. 300개 초과 집락이 발생한 경우 밀집 평판측정법에 따라 계산하였으며, 15개 미만의 집락을 얻었을 경우에는 가장 희석배수가 낮은 것을 측정하였다.

통계분석

각 균주 및 시료에 대한 실험은 5회 반복하여 수행하였고, 모든 값은 로그 값으로 변환하여 평균±표준편차로 나타내었다. 또한, Petricore™ 배양법과 PCA 배양법 간의 일관성 및 정확성을 확인하기 위해, AOAC 가이드라인[13]에 따라 평균차(mean difference), 반복표준편차(repeatability, S_r), 선형 회귀 분석(linear regression analysis, R^2), 상대표준편차(relative standard deviation, RSD), 생산성 비율(productivity ratio, P_r), 쌍체 t-검정(Paired t-test)을 사용하여 그 유효성을 검증하였으며, 분석 방법은 아래와 같다.

(a) 평균차(mean difference)–Petricore™ 배양법(candidate method)과 PCA 배양법(reference method) 간 평균 차이의 유의성은 ≤|0.50| Log 범위에서 판단하였다.

Mean difference=Candidate method–Reference method

(b) 반복 표준편차(repeatability, S_r)–두 배양법 간의 모든 시료의 반복 수에 대한 표준 편차로 나타내며, 그 공식은 아래와 같다.

$$S_r(\%) - \sqrt{\frac{\Sigma(x-\mu)^z}{N}}$$

(c) 선형회귀분석(linear regression analysis, R^2)–두 배양법 간의 결정계수를(correlation coefficient, R^2) 구하였다.

(d) 상대표준편차(relative standard deviation, RSD)–서로 다른 두 집단 간의 표준편차의 분포도를 표로 나타내었으며, 공식은 아래와 같다.

$$\text{RSD (\%)} = \frac{\text{Standard deviation}}{\text{Average of Log CFU/unit}} \times 100$$

(e) 생산성 비율(productivity ratio: P_r)–Petricore™에서 계수된 집락의 Log CFU를 PCA에서 계수된 집락의 값으로 나누어 서로 다른 두 방법 간의 성능 차이가 존재하는지 확인하는 방법으로, 공식은 아래와 같다. 일반세균배지의 경우 0.7이상일 때 성능차가 없다고 판단한다.

$$P_r = \frac{No}{Ns}$$

No: Colony count on candidate method
Ns: Colony count on reference method

(f) 쌍체 t-검정(Paired t-test): 두 배양법 간의 유의차를 확인하였다. $P<0.05$ 일 때 통계적으로 유의하다고 간주되었다.

Results

표준 균주 5종에 대한 정량적 성능 평가

ISO 11133[11]에 제시된 방법에 따라 5가지 표준 균주를 선정하여 제조된 Petricore™ 배양법의 정량적 성능을 평가하고 PCA 배양법과 통계적으로 비교 분석하였다. 그 결과, 두 배양법 간 가장 높은 평균차를 나타내는 균주는 *B. subtilis* ATCC 6633이며, 그 값은 0.05였다(Table 2). AOAC 가이드라인[13]에 따르면, 두 배양법의 평균차는 ≤|0.50| Log일 때 유의적 차이가 없다고 판단하므로, 표준 균주 5종에서 Petricore™ 배양법과 PCA 배양법 간의 유의적 차이가 없다고 판단하였다. P_r값은 모든 균주에서 0.7 이상으로 나타나 ISO 11133[11] 지침서의 건조필름배지 정량적 성능 평가 기준을 충족하였다. 쌍체 t-검정에서도 표준 균주 5종에서 Petricore™ 배양법과 PCA 배양법 간의 유의

Table 1. Reference strains used in this study

Bacterial strains	Source
E. coli ATCC 25922	ATCC
E. coli ATCC 8739	ATCC
S. aureus ATCC 25923	ATCC
S. aureus ATCC 6538	ATCC
B. subtilis ATCC 6633	ATCC

Table 2. Comparison of the performance evaluation of Petricore™ culturing method (candidate method) and PCA culturing method (reference method) for five reference strains

Bacterial strains	Total aerobic bacteria count (Log CFU/mL)		*P*-value	Mean difference	Productivity ratio
	PCA culturing method	Petricore™ culturing method			
E. coli ATCC 25922	9.04±0.01	9.06±0.05	0.41	0.02	1.06
E. coli ATCC 8739	9.80±0.09	9.81±0.07	0.69	0.01	1.02
S. aureus ATCC 25923	9.09±0.03	9.07±0.08	0.77	0.03	0.98
S. aureus ATCC 6538	9.09±0.03	9.04±0.04	0.15	0.04	0.91
B. subtilis ATCC 6633	7.09±0.05	7.14±0.04	0.13	0.05	1.12

적 차이가 발생하지 않았으며(P>0.05), S_r의 경우 Petricore™ 배양법은 0.04-0.08, PCA 배양법은 0.01-0.09의 범위로 나타나 Petricore™ 배양법이 분산도 측면에서 더 나은 결과를 확인할 수 있었다. Table 3을 보면, RSD 값은 1.0% 미만으로 USP의 미생물의약품 허용기준인 ≤15%을 충족하였다[15]. 이러한 결과는 Petricore™ 배양법이 PCA 배양법과 비교하여 균주 배양에서 성능 차이가 크지 않음을 나타낸다.

식품 시료에 대한 건조필름배지(Petricore™) 배양법의 정량적 성능 평가

미생물학적 관점에서 보았을 때, 평균차가 |0.50|일 시 유의적 차이가 없다고 판단한다[13]. Petricore™배양법과 PCA 배양법의 Log CFU/mL 비교에서 두 배양법 간 가장 높은 평균 차 값을 나타내는 시료는 냉동피자(0.71) 로, PCA 배양법과 유의적 차이가 있는 것으로 확인되었다(Table 7). 이를 제외한 모든 식품 시료의 평균차는 ≤|0.50|이므로 오염 수준에서 Petricore™ 배양법과 PCA 배양법 간의 유의적 차이가 없는 것으로 판단하였다(Table 4-8). PCA 배양법과의 S_r을 비교했을 때, Petricore™배양법은 대부분의 시료의 오염 수준에서 S_r이 더 낮은 것으로 확인되어 반복성이 우수하다고 판단되었다(Table 4-8). 또한, Petricore™ 배양법의 S_r 범위는 0.01-0.14, PCA 배양법은 0.02-0.12로 두 배양법의 반복성이 우수함을 확인하였다.

정밀도 평가를 위해 USP Chapter <1223> Validation of Alternative Microbiological Methods[15]에 명시된 RSD≤15% 기준에 따라 판단하였다. 모든 식품의 오염 수준에서 RSD

Table 3. Comparison of the reproducibility of Petricore™ culturing method (candidate method) and the PCA culturing method (reference method) for five strains

Bacterial strains	Relative standard deviation	
	PCA culturing method	Petricore™ culturing method
E. coli ATCC 25922	0.11	0.55
E. coli ATCC 8739	0.92	0.71
S. aureus ATCC 25923	0.33	0.88
S. aureus ATCC 6538	0.33	0.43
B. subtilis ATCC 6633	0.71	0.56

Table 4. Comparison of the performance evaluation of Petricore™ culturing method (candidate method) and PCA culturing method (reference method) for meat products (ground pork and bacon)

Matrix	Contamination level	Petricore™ culturing method		PCA culturing method		[1)]MD	*P* value
		Mean	RSD	Mean	RSD		
Ground pork	High	9.66±0.07	0.77	9.59±0.04	0.40	0.07	0.19
	Medium	7.76±0.08	0.98	7.64±0.07	0.90	0.12	0.09
	Low	6.94±0.03	0.40	6.82±0.10	1.50	0.12	0.09
Bacon	High	9.06±0.04	0.46	9.13±0.05	0.56	0.07	0.10
	Medium	6.52±0.04	0.55	6.52±0.06	0.92	0.00	1.00
	Low	6.71±0.05	0.68	6.83±0.04	0.66	0.12	0.01

[1)] MD: Mean difference.

Table 5. Comparison of the performance evaluation of Petricore™ culturing method (candidate method) and PCA culturing method (reference method) for fish products (tuna, salmon and shrimp)

Matrix	Contamination level	Petricore™ culturing method		PCA culturing method		[1)]MD	P value
		Mean	RSD	Mean	RSD		
Tuna	High	8.61±0.08	0.88	8.46±0.04	0.46	0.15	0.03
	Medium	6.93±0.07	0.99	6.50±0.06	0.97	0.43	0.12
	Low	2.34±0.05	2.13	2.57±0.07	2.71	0.23	0.10
Salmon	High	9.44±0.02	0.23	9.30±0.03	0.36	-0.14	0.00
	Medium	7.70±0.11	1.49	7.56±0.11	1.50	-0.14	0.12
	Low	6.00±0.03	0.44	6.01±0.03	0.49	0.1	0.75
Shrimp	High	8.95±0.04	0.49	8.75±0.06	0.74	0.20	0.00
	Medium	6.49±0.13	2.04	6.18±0.06	0.90	0.31	0.00
	Low	4.53±0.05	1.13	4.54±0.02	0.51	0.01	0.89

[1)] MD: Mean difference.

Table 6. Comparison of the performance evaluation of Petricore™ culturing method (candidate method) and PCA culturing method (reference method) for vegetables (spinach, lettuce and mushroom)

Matrix	Contamination level	Petricore™ culturing method		PCA culturing method		[1)]MD	P value
		Mean	RSD	Mean	RSD		
Spinach	High	8.49±0.06	1.42	8.37±0.04	0.44	-0.12	0.32
	Medium	8.42±0.08	0.99	8.14±0.10	1.24	-0.28	0.02
	Low	7.85±0.04	0.79	7.40±0.07	0.91	-0.45	0.00
Lettuce	High	7.30±0.01	0.19	7.25±0.05	0.64	-0.05	0.07
	Medium	5.79±0.03	0.46	5.81±0.05	0.91	0.02	0.72
	Low	6.38±0.02	0.24	6.29±0.04	0.63	-0.09	0.01
Mush -room	High	6.88±0.05	0.72	6.88±0.04	0.52	0.00	0.83
	Medium	4.66±0.07	1.48	4.61±0.06	1.39	-0.05	0.09
	Low	3.76±0.06	1.65	3.74±0.05	1.31	-0.02	0.56

[1)] MD: Mean difference.

Table 7. Comparison of the performance evaluation of Petricore™ culturing method (candidate method) and PCA culturing method (reference method) for processed foods (sandwich, ice cream and frozen pizza)

Matrix	Contamination level	Petricore™ culturing method		PCA culturing method		[1)] MD	P value
		Mean	RSD	Mean	RSD		
Sandwich	High	8.32±0.07	0.88	8.28±0,08	0.96	0.04	0.82
	Medium	7.12±0.14	1.95	6.96±0.07	0.99	0.16	0.12
	Low	5.14±0,07	1.03	5.26±0.05	0.99	0.12	0.00
Ice cream	High	8.22±0.03	0.81	8.24±0.05	0.57	0.02	0.91
	Medium	6.64±0.06	0.87	6.65±0.12	1.81	0.01	0.96
	Low	<1.0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Frozen Pizza	High	8.40±0.05	0.72	8.31±0.09	1.10	-0.09	0.13
	Medium	7.06±0.06	1.48	6.71±0.06	0.85	0.35	0.00
	Low	6.82±0.06	1.65	6.11±0.04	0.72	0.71	0.00

[1)] MD: Mean difference.

Table 8. Comparison of the performance evaluation of Petricore™ culturing method (candidate method) and PCA culturing method (reference method) for artificially contaminated foods (pasteurized milk and sausage)

Matrix	Contamination level	Petricore™ culturing method		PCA culturing method		[1)]MD	P value
		Mean	RSD	Mean	RSD		
Sterilized Milk	High	5.03±0.01	0.26	5.01±0.06	1.26	-0.02	0.53
	Medium	4.05±0.06	1.42	4.05±0.06	1.44	0.01	0.87
	Low	3.08±0.01	0.82	3.03±0.06	1.68	0.05	0.03
Sausage	High	4.92±0.03	0.63	4.94±0.03	0.60	0.03	0.51
	Medium	4.08±0.01	0.13	3.96±0.05	1.32	-0.12	0.05
	Low	3.13±0.02	0.57	2.96±0.03	0.93	-0.17	0.02

[1)] MD: Mean difference.

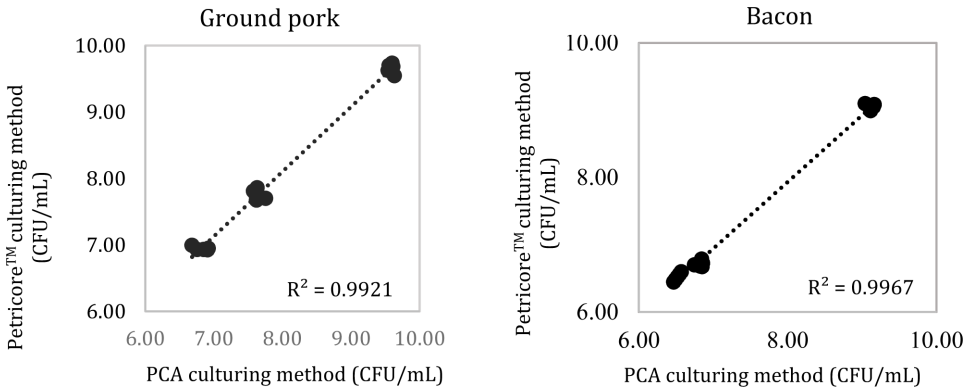

Fig. 4. Comparison of the linear regression analysis of Petricore™ culturing method (candidate method) and PCA culturing method (reference method) for meat products (ground pork and bacon).

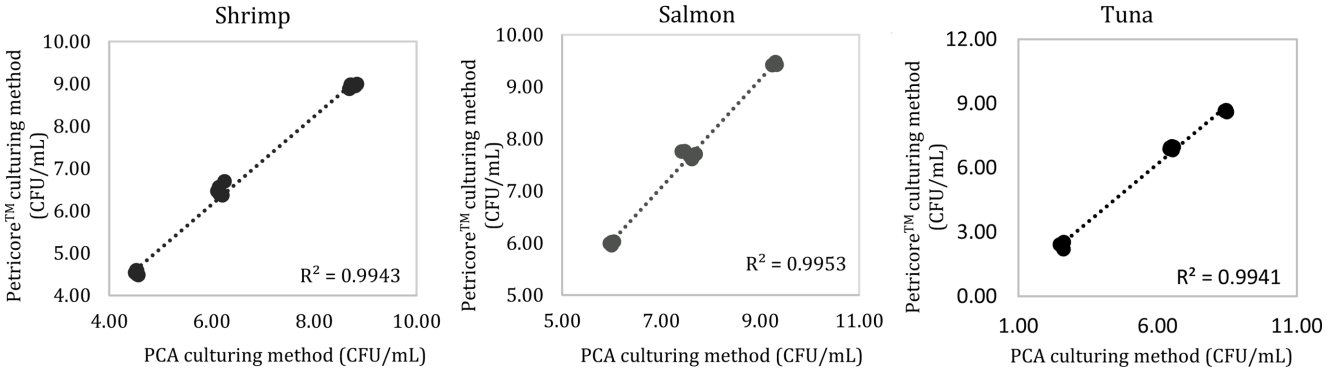

Fig. 5. Comparison of the linear regression analysis of Petricore™ culturing method (candidate method) and PCA culturing method (reference method) for fish products (shrimp, salmon and tuna).

가 ≤15%로 나타나, Petricore™ 배양법과 PCA 배양법의 동등성을 확보하였다(Table 4-8).

쌍체 t-검정을 통한 통계적 유의성 확인 결과에 따르면 육류제품에서는 낮은 수준으로 오염된 베이컨 제외한 모든 시료에서 P>0.05으로 PCA 배양법과 유의적인 차이가 없음을 확인하였다(Table 4). 어류제품에서는 참치와 연어는 중간 수준, 낮은 수준에서, 생새우는 낮은 수준에서 P>0.05 이므로 PCA 배양법과 유의적인 차이가 없음을 확인하였다(Table 5). 채소류에서는 시금치 중간 수준, 낮은 수준과 양상추의 낮은 수준을 제외한 모든 시료에서 P>0.05으로 PCA 배양법과 유의적인 차이가 없음을 확인하였다(Table 6). 가공식품에서는 샌드위치와 아이스크림은 높은 수준, 중간 수준에서, 냉동피자는 높은 수준에서 P>0.05으로 PCA 배양법과 유의적인 차이가 없음을 확인하였다

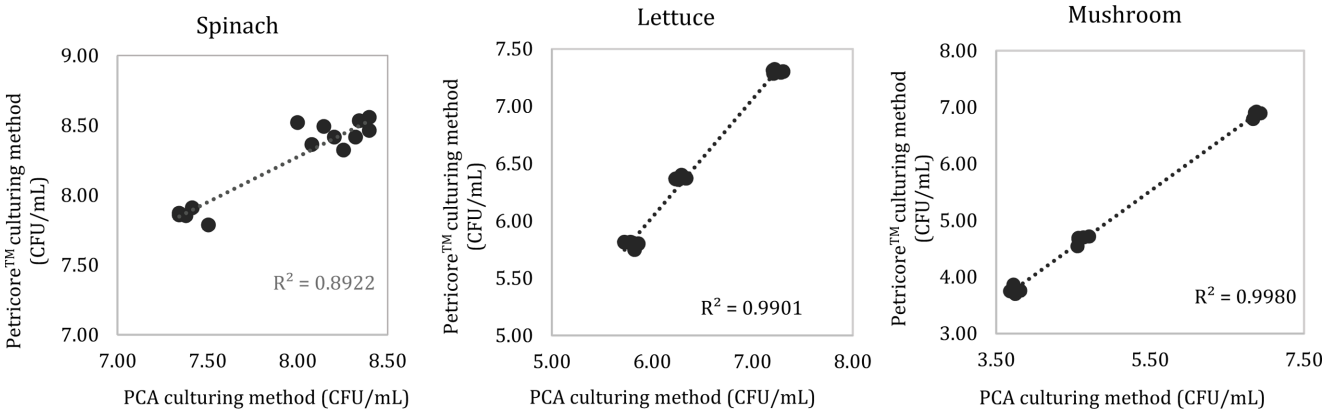

Fig. 6. Comparison of the linear regression analysis of Petricore™ culturing method (candidate method) and PCA culturing method (reference method) for vegetables (spinach, lettuce and mushroom).

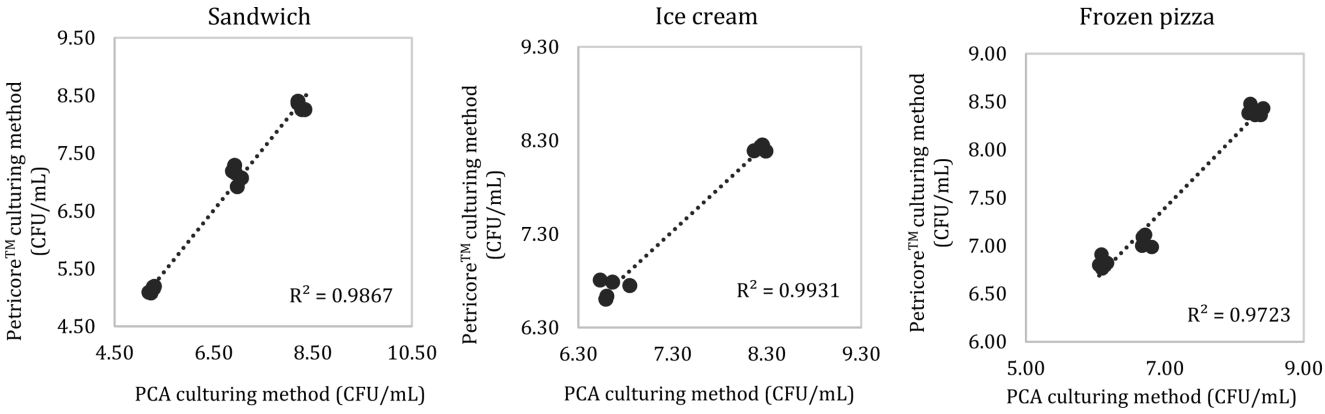

Fig. 7. Comparison of the linear regression analysis of Petricore™ culturing method (candidate method) and PCA culturing method (reference method) for processed foods (sandwich, ice cream and frozen pizza).

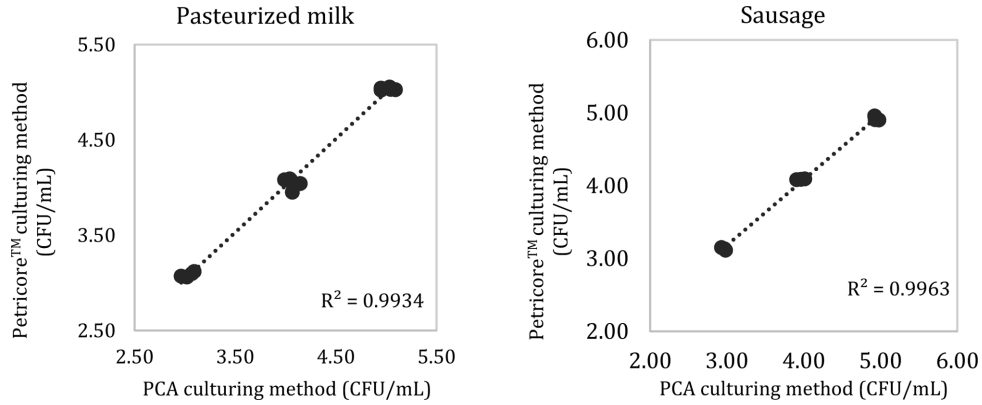

Fig. 8. Comparison of the linear regression analysis of Petricore™ culturing method (candidate method) and PCA culturing method (reference method) for artificially contaminated foods (pasteurized milk and sausage).

(Table 7). 인공오염을 통해 실험한 시료의 경우, 멸균우유와 어육소세지 모두 중간 수준에서 P>0.05으로 PCA 배양법과 유의적인 차이가 없음을 확인하였다(Table 8). 개별 제품에 대한 농도 별 P 값 비교가 최종 동등성 평가 기준은 아니며, 선형회귀분석과 함께 최종 동등성을 평가한다.

Petricore™ 배양법과 PCA 배양법을 비교하였을 때, 버섯(R^2=0.9980)과 베이컨(R^2=0.9967)에서 가장 높은 선형성을 보였으며 시금치(R^2=0.8922)가 낮은 값을 보였다(Fig. 4,6). 그러나, 대부분 식품 시료의 R^2은 ≥0.98으로 1에 가까운 결과가 나타났다(Fig. 4-8).

Discussion

표준 균주를 최적 배양 조건으로 배양하여 접종하였을 때 Petricore™ 배양법과 PCA 배양법 간의 미생물학적 성능 차이는 나타나지 않았으나, 식품 시료 내 미생물 검출에서는 두 방법 간의 차이가 나타났다. 쌍체 t-test 검정에서 *P*값을 비교한 결과, 베이컨은 낮은 수준에서, 냉동 참치와 연어는 높은 수준에서, 새우는 높은 수준, 중간 수준에서, 시금치는 중간 수준, 낮은 수준에서, 멸균 우유, 어육 소세지, 양상추, 샌드위치는 낮은 수준에서, 냉동피자는 중간 수준, 낮은 수준에서 $P<0.05$로 나타나 PCA 배양법과 유의적 차이가 있다고 판단하였다. 그러나, 냉동피자 낮은 수준을 제외한 모든 시료의 평균차는 ≤|0.50| 로 나타났다. Teramura 등[16]에 따르면 미생물학적 관점에서 볼 때, |0.50|의 평균차이는 실질적으로 유의한 차이로 간주되지 않으므로 두 방법 간의 실질적 유의차가 없는 것으로 판단하였다. 또한, S_r 결과에서 반복에 따른 정밀도를 평가했을 때에도 식품 시료 및 표준 균주에서 Petricore™ 배양법은 PCA 배양법과 비교하여 동등하다고 판단되었다.

Euracham 가이드라인[17]의 정의에 따르면, 정밀도는 시험결과 값들 간의 근접정도를 나타내는 인자로, 측정값의 반복성 및 측정의 재현성을 나타낸다. 식품의약품안전처의 정의에 따르면, 정밀도는 일반적으로 반복된 결과의 표준편차 또는 RSD로 나타낸다[18]. 실험 방법의 정밀도 측정을 위해 USP Chapter <1223> Validation of Alternative Microbiological Methods[15]에 명시된 RSD ≤15% 기준에 따라 판단하였다. 본 실험에서도 시험법의 반복성 및 재현성을 확인하기 위해 RSD로 나타내었다. 식품 시료에서 Petricore™ 배양법의 RSD 범위는 0.02-1.28이였으며, PCA 배양법은 0.40-2.71으로 Petricore™ 배양법의 RSD 범위가 더 작았는데, 이는 Petricore™ 배양법이 PCA 배양법에 비해 상대적으로 정밀도가 높았다고 판단할 수 있다. 따라서, 두 방법 모두 농도 별 일반세균수의 RSD값을 충족하였다.

유효범위내의 집락수가 많은 경우, PCA 배양법은 배지를 부었을 때 집락이 배지 안쪽에서 겹쳐 자라 정확한 계수가 불가능하거나 확산 집락의 형성으로 단일 콜로니의 식별이 어려웠다. 하지만 Petricore™ 배양법에서는 TTC의 발현으로 단일 집락을 비교적 쉽게 확인할 수 있었다.

상관 분석이란 서로 대등한 두 변수(X, Y)간의 직선적 관련성의 정도를 상관계수로 표현하고, 그 통계적 유의성 여부를 검증하는 방법이다[19]. 여기서 직선적 관련성이란 X축과 Y축 위에 각 점들을 그렸을 때, 이 점들의 전체적인 분포모양이 어느 정도 기울기를 갖는 가상의 직선에 가까워야 한다. 일반적으로 R^2값이 0.8 이상이면 매우 강한 상관관계, 0.4-0.8인 경우 중간정도의 상관관계, 0.4 미만인 경우 약한 상관관계에 있다[19]. PCA법에 의해 분리된 세균수의 Log값은 X축으로, Petricore™ 배양법에 의해 분리된 세균수의 Log값을 Y축으로 하여 두 방법에 의해 측정된 각 식품에서의 일반세균수를 플로팅(plotting)함으로써 구한 회귀직선의 기울기와 절편을 Fig. 4-8에 나타내었다. 그 결과, PCA 배양법과 Petricore™ 배양법은 모든 그래프에서 기울기가 0.8922-0.9967로 나타나 높은 상관성을 보여, 두 방법 모두 모든 식품시료에서 매우 강한 상관관계를 나타낸다는 것을 확인하였다.

일반세균 검사용 건조 재수화 필름 배지에는 몇 가지 제품이 상용화되어 사용되고 있다. 1) Neogen의 Petrifilm™은 1984년에 3M사에서 출시된 이후 현재까지 독창적인 특허 기술력으로 시장을 독점하고 있는 분말형태의 건조필름배지이다. Petrifilm™ 배지는 상위필름과 하위필름, 2개의 필름구조로 이루어져 있다. 상위필름은 폴리프로필렌필름, 접착제와 지시약 혼합, 수용성 겔로 이루어져 있고, 하위 필름은 영양 성분과 수용성 겔의 혼합, 접착제, 격자가 새겨진 폴리에틸렌 필름으로 이루어져 있다[10]. 2) JNC사의 MC-Media Pad는 플라스틱필름위에 수용성 중합체, 배지성분과 발색제 등이 함유된 다공질 메트릭스층(부직포)으로 구성하여 제작된 하부필름과, 투명한 커버필름으로 구성된 멸균 배양시트다[20]. 3) Kikkoman Easy Plate의 경우에 영양성분과 지지체가 혼합된 액체를 코팅한후 건조한 방식으로 방식으로 제작되었다[21]. 4) Meizheng Bio-Tech사의 MicroFast로 배지 구성은 easy plate와 동일한 형태 구성되어 있다.

본 연구에서 사용된 Petricore™는 Neogen사의 페트리필름과 동일한 형태의 구성을 가지고 있으나, 분말 조성과 한천 대신에 사용되는 젤 조성, 첨가제, 특화된 지시제 조성을 통해 상대적인 장점을 가지고 있다. 이는 동등성 시험 시 사용된 표준평판배지법 외에 참고로 AOAC OMA로 등재된 Neogen사의 페트리필름을 함께 사용하여 참조실험을 진행하였다. 기본적인 균주나 일반 시료에서는 동등한 성능을 확인할 수 있었으며, 특정 균주나 식품군에서는 차별화된 성능이 나타났다. 그 예로, 기존 건조필름배지에서 수화 현상 등에 의해 계수가 부정확하게 나타나는 아이스크림이나 바실러스균에 대해서 상대적으로 명확하게 계수할 수 있어 여러 상용 제품과 차별화가 가능할 것으로 예상된다. 이는 추후 다양한 균주 실험을 통해 확인될 필요가 있다. 따라서, 위의 내용을 종합해 보았을 때 제작된 Petricore™는 기존의 표준평판법을 대체하여 일반세균의 검출배지로 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

국문요약

건조필름배지(Petricore™)는 호기성 및 통성 혐기성 미생물의 배양을 위해 개발된 배지이다. 제작된 건조필름배지의 품질 평가는 ISO 11133 가이드라인에 따라 *Escherichia*

coli ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 등 5종의 표준 균주를 선정하여 표준 평판배지와의 비교 시험을 통해 정량 실험을 실시하였다. 5가지 표준 균주를 대상으로 한 생산성 비율(productivity ratio, P_r)이 0.70보다 높았으며 상대 표준 편차 값은 3.0%보다 낮았다. 또한 13가지 식품(간 돼지고기, 베이컨, 생연어, 참치, 생새우, 시금치, 양상추, 버섯, 샌드위치, 아이스크림, 냉동피자, 멸균우유, 어육소세지)을 대상으로 제작된 Petricore™의 배지 성능을 미국식품의약품안전처의 'Bacteriological Analytical Manual (BAM) 제3장: 표준한천배지법'에 사용된 plate count agar (PCA)배양법과 비교 검증하였다. 또한 시험된 식품시료에 대해서는 세 가지 다른 오염 수준(높음, 중간, 낮음)에서 비교 연구가 수행되었다. 평균차, 반복표준편차(S_r), 선형회귀분석(R^2), 상대표준편차(RSD)과 생산성 비율(P_r)을 측정하였다. 통계처리는 쌍체 t-검정을 통해 얻어진 P값(P<0.05)을 기준으로 평가하였다. 표준균주를 사용한 성능시험 결과, 5종 균주 모두에서 P_r≥0.7의 결과값을 나타내어 제작된 Petricore™의 정량 성능이 확인되었다. 또한 쌍체 t-검정시 두 방법 간의 유의적 차이가 없어(P>0.05) Petricore™ 배양법과 PCA 배양법 간의 동등성을 확인하였다. 실제 식품을 대상으로 하는 비교 검증 실험에서는 모든 식품실험군에서 두 방법 간의 직선성이 R^2<0.9이었으며, 냉동피자를 제외한 모든 식품군의 평균차는 ≤|0.50| 내에 있었다. Petricore™ 배양법의 재현성은 0.01-0.14로 PCA 배양법(0.02-0.12)과 유사하였다. 상대표준편차는 RSD≤15%로 정밀도가 높음을 나타내었다. 본 실험 결과를 통해 제작된 Petricore™는 여러 식품군에서 호기성 및 통성 혐기성 미생물 검사 시 표준배지 시험법을 대체하는 신뢰할 수 있는 대안 방법으로 사용할 수 있음을 확인하였다.

Conflict of interests

The author of PNG BIOMED Co., Ltd declare that they work for the company.

ORCID

Won-Ki Sung https://orcid.org/0009-0003-9358-071X
Yu-Ri Choi https://orcid.org/0009-0007-4750-4272
Se-Wook Oh https://orcid.org/0000-0002-8580-6032

References

1. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), (2024, April 23). Korean food standards code. Retrieved from https://various.foodsafetykorea.go.kr/fsd/#/ext/Document/FC
2. Cho, M.H., Bae, E.K., Ha, S.D., Park, Y.S., Mok, C.K., Hong, K.P., Kim, S.P., Park, J.Y., Evaluation of dry rehydratable film method for enumeration of microorganisms in meat, dairy and fishery products. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **37**, 294-300 (2005).
3. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), 2021. Interpretation guide to microbiological test methods in the Korean food code, 2021 revised edition, MFDS, Cheongju, Korea, pp 3-19.
4. Gordon, A., 2020. Food Safety and Quality Systems in Developing Countries, Vol. III: technical and market considerations, Academic press, New York, NY, USA.
5. Silliker, J.H., Slanetz, L.W., Chichester, C.O., Gaufin, A.R., Ordal, Z.J., 1963. Total counts as indices of food quality. Microbiological quality of foods, Academic Press, New York, NY, USA, pp. 102-112.
6. Stannard, C., Development and use of microbiological criteria for foods. *Food Sci. Technol. Today*, **11**, 137-177 (1997).
7. Kim, K.S., Bae, E.K., Ha, S.D., Park, S.Y., Mok, C.K., Hong, K.P., Kim, S.P., Park, J.Y., Evaluation of dry rehydratable film method for enumeration of microorganisms in Korean traditional foods. *J. Food Hyg Saf.,* **19**, 209-216 (2004).
8. Freese, T., Elzinga, N., Heinemann, M., Lerch, M.M., Feringa, B.L., The relevance of sustainable laboratory practices. *RSC Sustain*., **2**, 1300-1336 (2024).
9. Park, H.K., Evaluation of dry rehydratable film method for detection of coliform bacteria and *Escherichia coli*. *Korean J. Food Nutr.,* **22**, 696-700 (2009).
10. Hansen, P.E., Nelson, R.L., 1986. Dry culture media, U.S. Patent 4565783.
11. International Organization for Standardization (ISO), (2024, April 23). ISO 11133:2014(en). Retrieved from https://www.iso.org/obp/ui/#!iso:std:53610:en
12. U.S. Food and Drug Administration (FDA), (2024, April 28). Bacteriological analytical manual (BAM). Retrieved from https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bacteriological-analytical-manual-bam
13. Brunelle, S., LaBudde, R., Nelson, M., Wehling, P., 2012. AOAC International methods committee guidelines for validation of microbiological methods for food and environmental surfaces, AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.
14. International Organization for Standardization (ISO), (2024, May 5). 16140-2:2016(en). Retrieved from https://www.iso.org/obp/ui/en/#iso:std:iso:16140:-2:ed-1:v1:en
15. The United States Pharmacopeial Convention (USP), (2024, May 5). Validation of alternative microbiological methods. Retrieved from https://doi.usp.org/USPNF/USPNF_M99943_03_01.html
16. Teramura, H., Betts, G., Chen, Y., Brodsky, M., Salfinger, Y., MC-Media Pad ACplus™ for enumeration of aerobic counts in a variety of foods. *J. AOAC Int.*, **101**, 769-782.
17. Magnusson, B., Tsimillis, K.C., (2024, May 9). Eurachem guide: Accreditation for microbiological laboratories. Retrieved from https://www.eurachem.org/index.php/publications/guides/microbiol
18. Hwang, J.Y., Lee, S.W., Kim, K., Huh, Y., Yoo, E.J., Kim,

B.K., Kim, H.J., Lee, H.R., Ko, S.H., Kim, J.H., Jeon, S.A., Lee, J.J., Lee, K.R., Hong, S.Y., Chung, H.M., Choi, J.W., Comparison of method validation for test and inspections. *J. Environ. Anal. Health Toxicol*., **22**, 104-116 (2019).

19. Park, Y.G., Correlation and regression analysis. *J. Korean Acad. Fam. Med.*, **22**, 43-51 (2001).
20. Ushiyama, M., 2001. Microorganism culture material containing a water-soluble polymer layer and a porous matrix layer, U.S. Patent 6265203B1.
21. Waku, S., Miyagi, M., Saito, R., Ueki, T., Baba, T., Kinoshita, M., 2013. Microorganism culture sheet, U.S. Patent 20200231930A1.