

자동화 장비를 사용한 화장품중의 미생물 검출에 대한 연구

김은영[†]·장석태·정성운·홍태원*

(주)엘지생활건강 화장품 품질보증팀, *EM Corporation

A Study on the Microbial Measurement for Cosmetics Using Automated Methods

Eun-Young Kim[†], Seok-Tae Jang, Soung-Oun Choung, and Tae-Won Hong*

Cosmetics Quality Assurance Team, LG Household & Healthcare Ltd., 150-32, Songjeong-dong, Hungduk-gu,
Cheongju-si, Chungbuk 361-721, Korea

*EM Corporation

요약: 화장품중의 미생물을 검출하는데 소요되는 시간을 48~72 h에서 24 h 이내로 단축하고자 하는 목적으로 자동화 방법으로 ATP bioluminescence 시스템과 impedance 시스템에 대한 비교 평가를 수행하였다. 인위적으로 저농도의 미생물로 오염시킨 에멀전 제형에 대하여 표준 한천 평판 배지법과 ATP bioluminescence 방법 및 impedance 측정 방법으로 분석을 실시한 결과에서 모두 유의한 검출 결과를 나타내었으며, 실제 적용 실험 결과에서도 각각 95% 이상의 좋은 상관관계를 나타내었다. 오염균으로는 표준 균주로서 *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*와 사내 현장 검출 균주인 *Ralstonia mannitolilytica*를 사용하였다. 본 검증 결과에 따라 화장품의 미생물 품질 관리 방법으로 ATP bioluminescence 방법 또는 impedance 측정 방법을 활용한 자동화 장비의 사용을 통해 신속한 품질 판정이 가능하게 되었다.

Abstract: ATP bioluminescence system and impedance system were evaluated with the objective of reducing the time for microbial analysis of cosmetics formulations from 72 to 24 h. The meaningful correlation (at least 95%) was achieved when emulsion were artificially contaminated with low levels of different organisms, including *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Ralstonia mannitolilytica*. The standard agar plate method, ATP bioluminescence and impedance method were used for in this study. Successful evaluation and validation of automated systems has enabled the introduction of ATP bioluminescence and impedance method into routine use within the microbiology laboratory. This has provided a rapid assessment of product quality, resulting in faster throughput and resource maximization.

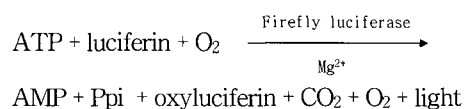
Keywords: microbial analysis, cosmetics, rapid assessment, ATP bioluminescence, impedance

1. 서 론

화장품의 미생물학적 품질에 대해서 지속적으로 그 중요성이 강조됨에 따라 일반생균수를 검사하여 규격 이내로 관리하는 시험방법으로서 기존의 표준 시험 방법인 한천 평판 배지법으로 약 48~72 h 이상 소요되는 것을 단축시키기 위하여 새로운 자동화 장비 기술의 미생물 시험방법이 빠르게 개발되고 있는 추세이다[1]. 그 중에서 실제 적용 가능성을 사전 평가하여 선정된 생물학적 발광 반응을 이용하는 ATP bioluminescence 방법과 impedance 측정 방법에 대하여 한천 평판 배지법에 비교한 실험

결과를 검증하고자 본 연구를 수행하였다.

생물학적 발광(bioluminescence)이란 살아있는 유기체 내에서 생물학적인 반응으로 인해 여기된 분자가 광자를 방출하면서 기저상태로 되돌아가는 과정을 말하며 이 반응은 효소에 의해 촉매화된다. 모든 살아있는 세포는 생물학적 에너지원으로서 ATP (adenosine triphosphate)를 가지며 보통 미생물에는 한 세포당 1~10 fg 정도의 미량의 ATP가 포함되어 있는데, 이 미생물 중의 ATP를 반딧불(firefly)에서 추출한 luciferase와 반응시킬 때 다음과 같은 기전에 의하여 생물학적 발광을 일으키게 된다[2,3].



[†] 주 저자 (e-mail: eykimb@lgcare.co.kr)

이 발광 반응을 측정함으로써 ATP를 정량적으로 분석하여 시료중 생균의(viable cell) 존재 유무 등을 확인할 수 있는 것이 ATP bioluminescence 방법이다[4].

Impedance 측정방법의 기본 원리는 미생물의 대사 과정에서 단백질과 같은 큰 분자의 영양 물질이 전하를 가진 작은 분자 물질로 분해됨에 따라 액체 배지의 전기전도도를 변화시키고 더 낮은 저항값을 갖게 되는 것을 이용하는 방법으로, 액체 배지가 들어있는 cell 안에서 최소한 2개의 전극이 있고 그 전극에 AC 전압을 주입할 때 AC 전류상에 impedance가 발생하는데, 액체 배지 안에서 배양 시간에 따른 이온의 변화는 전형적인 미생물 성장 곡선의 3가지 변화 범위인 lag phase, exponential phase, stational phase와 매우 유사한 곡선을 나타내게 된다[5,6]. 따라서 배양 과정에서 특징적인 impedance 곡선의 변곡점을 기준으로 threshold를 설정하여 생균의 존재 유무를 판정하는 것이다[7].

이러한 기본 원리를 바탕으로 의약품, 화장품, 식품 등의 생균수 측정, 항생제 감수성 측정, 방부 살균제의 방부력 측정 등 미생물 분야에서 자동화 장비를 사용하는 방법을 개발하여 신속한 측정 수단으로 이용하고자 하는 연구가 세계적으로 활발히 진행되고 있으며[8,9], 본 연구에서는 특히 화장품의 세균 오염도를 측정하는데 이용하고자 그 가능성에 대한 기초 연구를 수행하였다.

2. 실험 방법

2.1. 기기 및 시약

발광 반응의 측정은 영국 Celsis사의 Advance coupe를 사용하였으며 발광 효소 시약은 동사의 LuminATE HS (luciferin/luciferase), LuminATE buffer, LuminEX를 사용하였다.

Impedance 분석 장비는 오스트리아 SY-LAB사의 Bac-Trac 4300을 사용하였으며, impedance 측정용 액체 배양 배지로서 동사의 BiMedia 001A (general-impedance media)를 사용하였다.

2.2. 사용 균주

미생물 시험방법의 검증을 위한 균주로는 대표적인 표준균주로서 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15522, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 10536를 사용하였고, 사내 현장에서 분리한 균주인 *Ralstonia mannitolilytica*를 한국 미생물 보존 센터에서 동정하여 사용하였다.

2.3. 인위적으로 오염시킨 화장품 시료의 제조

P. aeruginosa, *S. aureus*, *E. coli*와 사내 현장 검출

균주인 *Ralstonia mannitolilytica*의 혼합 균주를 0.1% 펩톤수에 현탁시킨 것을 오염 균액으로 하여 로션 type의 에멀전 화장품 시료에 대하여 초기 균수 10^2 CFU/mL 정도의 저농도로 접종하였다.

2.4. 세균내 ATP의 추출 및 발광 반응 측정

Nutrient broth에서 순수 배양한 *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*의 혼합 균주를 0.1% 펩톤수로 $10^5 \sim 10^9$ CFU/mL의 농도로 현탁시킨 것을 검액으로 하고, 검액 50 μ L에 LuminEX 200 μ L를 혼합하여 10 s간 세균 ATP를 추출시킨 후 luciferin-luciferase시약 100 μ L를 가하고 10 s간 Advance coupe로 빛의 양을 RLU로서(relative light unit) 측정하였다. 따로 각각의 검액을 적당히 희석하여 1 mL를 nutrient agar 배지에 도말하고 37°C에서 3일간 배양하여 형성된 집락수를 mL당 생균수로 산출하여 비교하였다.

2.5. 세균 배양 과정의 Impedance 측정

Nutrient broth에서 순수 배양한 *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* 및 사내 현장 검출 균주인 *Ralstonia mannitolilytica*를 각각 0.1% 펩톤수로 10^{3-4} CFU/mL의 농도로 현탁시킨 것을 검액으로 하여 배양 액체 배지 9 mL가 들어있는 measuring cell에 검액 1 mL를 가하고, 37°C에서 배양하면서 균종별로 증균 배양에 따른 impedance의 변화를 측정하였다.

2.6. 인위적으로 오염된 화장품 시료중의 세균 검출 실험

2.3에서 제조한 화장품 시료 1 g을 SDC (soybean digest casein) broth 9 mL로 희석한 것을 검액으로 하였다.

2.6.1. ATP Bioluminescence 방법

검액 50 μ L에 LuminEX[®] 200 μ L를 혼합하여 10 s간 세균 ATP를 추출시킨 후 luciferin-luciferase 시약 100 μ L를 가하고 Advance coupe로 빛의 양을 측정하였다. 또한 검액을 37°C, 120 rpm으로 진탕 배양하면서 시간대별로 같은 방법으로 발광을 측정하였다. 따로 시간대별로 진탕 배양중인 검액 1 mL를 SDC agar 배지에 도말하고 37°C에서 48 h 배양하여 형성된 집락수를 mL당 생균수로 하여 증균 정도를 확인하였다.

2.6.2. Impedance 방법

배양 액체 배지 9 mL가 들어있는 measuring cell에 검액 1 mL를 가하고, 37°C에서 배양하면서 impedance의 변화를 측정하였다.

Table 1. Protocol and Criteria

| Media/Method | Plate method | ATP method | Impedance method |
|-----------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------------------|
| Diluent | SDC broth | SDC broth | SDC broth |
| Media | SDC agar plate | SDC broth 9 mL | Bimedia 001A 9 mL |
| Temperature | 37°C | 37°C | 37°C |
| Protocol | Add 1g to 9 mL of diluent | Add 1g to 9 mL of diluent | Add 1g to 9 mL of diluent |
| | Spread 1 mL to media | Add 1mL to media | Add 1 mL to media |
| | Incubate for 48 h | Incubate for 24 h | Incubate for 24 h |
| | Count colonies | Measure RLU with Celsis | Measure impedance during incubation |
| Criteria | Number of colonies | RLU > control × 5 | M value > 3% |
| Detection limit | 10 CFU/mL | 10 CFU/mL | 10 CFU/mL |

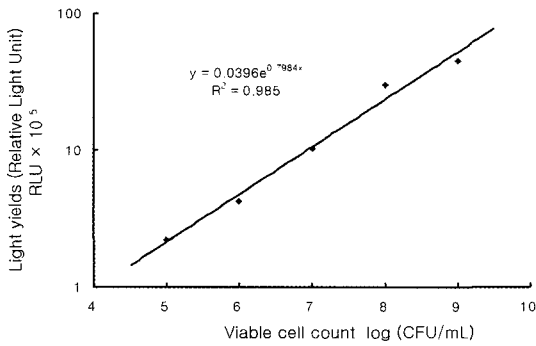


Figure 1. Relationship between light yields and viable cell count.

2.7. 표준 한천 평판 배지법과 자동화 방법의 상관 분석
 일부를 인위적으로 오염시킨 에멀전 시료 100개에 대하여 Table 1의 시험 방법 및 기준에 따라 적용한 실험 결과를 가지고 상관 분석을 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. ATP Bioluminescence 방법에서 세균수와 발광량의 상관 관계

세균 ATP의 추출 후 luciferin-luciferase 반응에 의한 발광량은 $10^5 \sim 10^9$ CFU/mL 범위에서 세균수에 지수적으로 거의 일직선으로 비례하여 세균 세포로부터 ATP의 추출이 거의 완전함을 보여주었다(Figure 1). 이 때 검출 한도 세균수는 10^5 CFU/mL 수준이었다.

3.2. 세균 배양에 따른 Impedance 변화 측정

초기 균수 10^3 CFU/mL에서 시작한 4종의 균주는 각각 증균 배양에 따라 배지 내부의 전기전도도에 변화가 나타나면서 성장 패턴과 유사한 impedance curve를 보여주었다(Figure 2). Relative impedance로서 M value 3%를

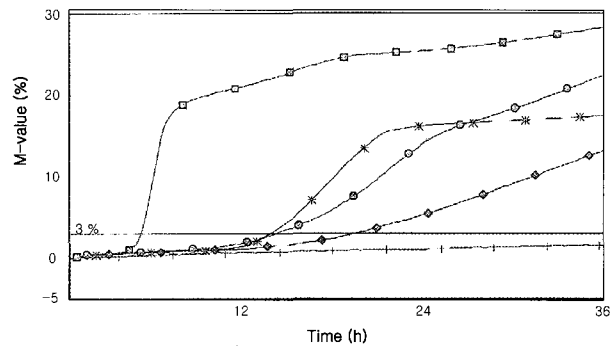


Figure 2. Comparison of impedance curves of 4 kinds of bacteria.

■: *Escherichia coli*, ※: *Staphylococcus aureus*,
 ●: *Pseudomonas aeruginosa*, ◆: *Ralstonia mannitolilytica*,
 +: control

threshold로 했을 때 검출 시간은 *Escherichia coli* 4.9 h, *Staphylococcus aureus* 13.5 h, *Pseudomonas aeruginosa* 14 h, 사내 현장 검출 균주인 *Ralstonia mannitolilytica*의 경우 19.2 h으로 균종에 따라 impedance curve 및 검출 시간에 큰 차이를 나타내었는데, 이는 균종별 성장 속도 및 패턴의 차이에 기인하는 것으로 생각되며, 특히 일반적으로 사용하는 표준 균주에 비해 사내 검출 균주의 경우 impedance 변화가 느리게 나타난 점에 유의할 필요가 있다.

3.3. 인위적으로 오염시킨 화장품중의 일반 생균 검출 실험 결과

3.3.1. ATP Bioluminescence 방법

발광 반응으로 즉시 검출되지 않는 저농도의(4×10^2 CFU/mL) 혼합 균주로 오염시킨 에멀전 시료를 SDC broth medium에서 배양시키면서 시간별로 발광 반응을

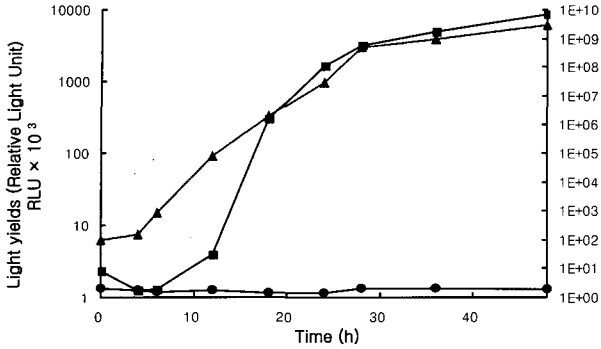


Figure 3. Comparison of growth curves monitored by bioluminescence method (■) and viable cell count (▲) in SDC broth medium (●- RLU control).

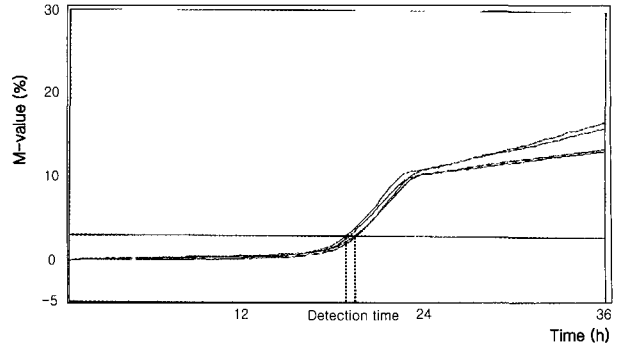


Figure 4. Impedance curves and detection time of low-contaminated emulsion.

Table 2. Results of Three Kinds of Microbial Analysis

| No. detected by traditional method | CFU/mL detected | Results | No. detected by ATP method | No. detected by impedance method |
|--|-----------------|----------------|--------------------------------|--------------------------------------|
| 9 | < 100 | True positive | 9 | 8 |
| | | False negative | 0 | 1 |
| 3 | ≥ 100 | True positive | 3 | 3 |
| | | False negative | 0 | 0 |
| No. not detected by traditional method | CFU/mL | Results | No. not detected by ATP method | No. not detected by impedance method |
| 88 | < 10 | True negative | 87 | 88 |
| | | False positive | 1 | 0 |

측정한 결과, 18 h 증균 배양 후 발광치가 RLU로써 오염되지 않은 대조 시료의 5배 이상으로 증가되어 양성 결과로 검출되었으며, 검출 시점에서 broth medium 중의 생균수는 2×10^6 CFU/mL까지 증균되어 있었다(Figure 3). 따라서 적용 실험 방법에서 24 h 배양 후에 발광치를 측정하기로 선정하였다.

3.3.2. Impedance 방법

저농도의 (4×10^2 CFU/mL) 혼합 균주로 오염시킨 에멀전 시료를 전기저항의 측정이 가능한 measuring cell의 액체 배지에서 배양시키면서 시간별로 impedance 변화를 확인한 결과 relative impedance로서 M value 3%를 threshold로 했을 때 19 h에서 양성으로 검출되었으며, 동일한 시료의 4회 반복 실험에서 검출 시간은 최대 19.32 h, 최소 18.61 h으로 좋은 재현성을 나타내었다(Figure 4).

3.4. 표준 한천 평판 배지법과 자동화 방법의 상관 분석

시료 100개 중 일부가 인위적으로 오염되어 있는 에멀전 시료에 대하여 한천 평판 배지법과 두 가지 자동화 시험법으로 실험을 실시한 결과 Table 2와 같이 95% 이

상의 좋은 상관 관계를 얻었다. 한천 평판에서 세균이 검출된 12건에 대하여 ATP 방법의 경우 모두 검출하였고 impedance 방법의 경우 오염 시료 1개를 검출하지 못하였다. 이때 해당 시료의 검출 균수는 10 CFU/mL로 확인되어 검출 한계 근처에서 검출해내지 못한 것으로 판단된다. 또한 한천 평판에서 미검출 시료 88건에 대해서는 impedance 방법은 모두 일치하는 결과를 보였는데, ATP 방법에서는 1건에서 검출의 결과를 나타내었다. 이는 한천 평판 배지법에서 검출하지 못한 10 CFU/mL 이하의 저농도 오염 시료를 ATP 방법에서는 검출해 낸 결과로 예상된다.

4. 결 론

화장품의 미생물학적 품질 관리에 있어서 신속한 오염 여부 판정을 위한 대안으로서 자동화 시험 방법인 ATP bioluminescence 방법과 impedance 측정 방법에 대하여 한천 평판 배지법에 비교 검증한 결과,

- 1) 인위적으로 오염시킨 에멀전 시료(4×10^2 CFU/mL)의 시험 결과에서 미생물 검출 시간은 표준 한천 평판

배지법이 48 h, ATP 방법이 24 h, impedance 방법이 19 h으로 자동화 방법에서 미생물 검출 소요 시간이 크게 단축되었다.

2) 예멸진 시료에 대한 실제 적용 결과에서 ATP bioluminescence 방법과 impedance 측정 방법 모두 한천 평판 배지법의 실험 결과와 95% 이상의 좋은 상관관계를 나타내어 신속한 미생물 시험 방법으로서 자동화 장비 사용 방법의 사용 가능성이 확인되었다.

3) ATP bioluminescence 방법의 경우 세균수와 발광 반응에 따른 light yield (RLU) 사이에 직선 정량성을 나타내어 RLU의 비교에 의한 오염 여부 판정 결과의 높은 신뢰도를 확보할 수 있었으나, 일정 시간의 배양 후에만 검출 여부를 판정할 수 있고 효소 발광 반응에 필요한 시약의 비용이 고가인 단점이 있었다.

4) Impedance 측정 방법의 경우 배양 시간에 따른 impedance 변화 curve를 실시간으로 관찰할 수 있고 threshold에 의해 ATP 방법보다 빠른 시간내에 판정이 가능하며 시험 비용도 상대적으로 낮은 장점이 있으나, 전기전도도를 이용하기 때문에 실험실의 전압 환경, 시료 중 성분의 영향 등 추가적인 검토가 필요할 것으로 사료된다.

지금까지 화장품의 품질 관리 항목 중 납기, 결품 등 생산 관리적인 측면에서 미생물 시험 항목이 매우 어려운 일로 생각된 것이 사실이다. 특히 국내외적으로 소비자 입장에서의 품질 보증이 어느 때보다도 강조되고 있는 시점에서 빠르고 신뢰성 있는 미생물 시험 방법의 검증 및 적용을 통해 완전한 품질의化妆품을 공급하는데 기여하고자 하였다.

본 연구의 대상인 ATP bioluminescence 방법과 impedance 측정 방법 모두 새로운 rapid microbial method로서 적합한 정도의 신뢰성을 확보할 수 있었으며, 앞으로 화장품 유형별로 개별적인 validation을 통해 적용이 가능할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. M. H. Brodsky, Rapid methods and automation in microbiology, Intern. Symp., American Society of Microbiology, Washington, D. C. (1982).
2. M. Serio and M. Pazzagli, Luminescent assays (perspectives in endocrinology and clinical chemistry), Raven Press, New York (1982).
3. L. J. Kricka and P. E. Stanley, Analytical applications of bioluminescence and chemiluminescence, Academic Press Inc., London (1984).
4. A. Lundin and S. Bergman, Detection of bacteria by luciferase assay of adenosine triphosphate, *J. Clin. Microbiol.*, **1**, 1 (1975).
5. R. Ruth and G. Eden, Impedance microbiology, Research Studies Press, Hertfordshire, England (1984).
6. J. B. Allison, J. A. Anderson, and W. H. Cole, The method of electrical conductivity in studies of bacterial metabolism, *J. Bacteriol.*, **36**, 571 (1983).
7. P. Cady, D. Hardy, and S. Martins, Automated impedance measurements for rapid screening of milk microbial content, *J. Food Prot.*, **41**, 277 (1978).
8. D. W. Agar, Microbial growth rate measurement technique, *Comprehensive Biotechnology*, **4**, Pergamon Press, New York (1985).
9. K. Morwood, E. Abley, J. Kay, and T. Ling, The use of ATP bioluminescence technology for the detection of microbial contamination in personal care products, Intern. Symp., American Society of Microbiology, Washington, D. C. (1997).