

## 화장품 미생물한도시험 사례 - 총호기성생균수 및 특정세균시험

화장품 미생물한도시험에 대한 자세한 설명을 곁들여 실무자가 쉽게 총호기성생균수 및 특정세균시험을 수행할 수 있도록 '화장품 미생물한도시험 사례'를 마련함

### 1. 화장품 미생물한도시험사례 마련 배경 및 개요

#### ○ 배경

- 화장품의 안전관리를 강화하고자 미생물한도 기준 적용대상이 눈화장용 제 품류 및 영유아용 제품류에서 전유형으로 확대됨에 따라 다양한 제형의 화장품에 대하여 미생물한도시험을 수행하는데 어려움이 있음.
- 실무자들이 미생물한도 시험방법에 따라 쉽게 시험을 수행할 수 있도록 화 장품 제형별 미생물한도시험 사례를 마련하여 유통 화장품의 안전성 확보 에 기여하고자 함.

#### ○ 개요

- 「화장품 안전기준 등에 관한 규정」-[별표4] 유통화장품 안전관리 시험방 법 중 미생물한도시험법을 근거로 다양한 제형에 따른 화장품의 총호기 성생균수 및 특정세균시험방법을 사례를 들어 자세히 설명함.

### 2. 검체의 전처리방법

검체조작은 무균조건하에서 실시하며, 검체의 특성에 따라 다음의 각 방법으로 검체를 희석, 용해, 부유 또는 현탁시킨다.

가) 수분산 검체 : 검체 1 mL에 변형레틴액체배지 또는 총 호기성 생균수 시험 법의 배지의 적합성시험과 미생물 발육저지물질의 확인 시험을 통하여 검 증된 배지나 희석액 9 mL를 넣어 10배 희석액을 만들고 필요시 희석한다.

#### 1. 액제 및 로션제

검체 1 mL(g)에 변형레틴액체배지 또는 검증된 배지나 희석액 9 mL를 넣어 10배 희석액을 만들고 희석이 더 필요할 때에는 같은 희석액으로 조제한다.

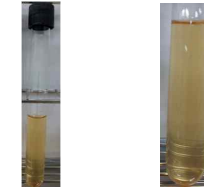
##### <기초화장품화장용 제 품류 -영양화장수>



10배 희석 ▶ 검액

대부분 영양 화장수는 분산제를 처리할 필요 없이 배지 및 희석액으로 10배 희석하여 검 체를 전처리한다.

##### <손발톱용-네일이나멜 리무버>



10배 희석 ▶ 검액

대부분 네일이나멜 리무버는 분산제를 처리 할 필요 없이 배지 및 희석액으로 10배 희석 하여 검체를 전처리한다. 다만 미생물발육저 지물질이 확인되면 중화제로서 폴리소르베이 트 80 등을 첨가한다. 적절한 중화제의 농도 는 미생물발육저지물질 확인시험을 통하여 설정하도록 한다.

##### <눈화장용-아이라이너(액상타입) >



10배 희석 ▶ 검액

눈화장용 아이라이너는 제품의 제형에 따라 액상, 고형제 및 젤타입이 있으며, 액상 아이 라이너 제품류의 경우, 분산제를 처리할 필요 없이 배지 및 희석액으로 10배 희석하여 검 체를 전처리한다.

**< 기초화장용 제품류-로션 >**



10배 희석 ▶ 검액

대부분 로션은 분산제를 처리할 필요 없이 배지 및 희석액으로 10배 희석하여 검체를 전처리한다. 다만, W/O(Water in Oil)형 로션의 경우 분산제를 사용하여 검체를 전처리한다.

나) 비수분산 검체 : 검체 1 g(mL)에 적당한 분산제 (예 : 멸균한 폴리소르베이트 80) 1mL를 넣어 균질화 시키고 변형레틴액체배지 또는 총 호기성 생균수 시험법의 배지의 적합성시험과 미생물 발육저지물질의 확인 시험을 통하여 검증된 배지나 희석액 8 mL를 넣어 10배 희석액을 만들고 필요시 희석한다. 균질화 되지 않을 경우 5 mm 유리구슬 5~7개 (3 mm 유리구슬 10~15개)를 넣어 균질화시키고 변형 레틴액체배지 또는 총 호기성 생균수 시험법의 배지의 적합성시험과 미생물 발육저지물질의 확인 시험을 통하여 검증된 배지나 희석액을 넣어 10배 희석액을 만들고 필요시 희석한다. (단, 사용하는 분산제는 미생물의 생육에 대하여 영향이 없는 것 또는 영향이 없는 농도에서 사용한다)

**2. 크림제**

검체 1 mL(g)에 적당한 분산제 1 mL를 넣어 균질화 시키고 변형레틴액체배지 또는 검증된 배지나 희석액 8 mL를 넣어 10배 희석액을 만들고 희석이 더 필요할 때에는 같은 희석액으로 조제한다.



**참고1**

크림제 검체 특성상 점도가 있어 마이크로피펫으로 검체 취하는 어려움이 있는 경우, Capillary piston 팁을 사용하면 검체 조작이 용이하다.

**참고2**

크림제는 희석만으로 검체 전처리가 용이하기도 하지만, 일부 제품(검체2 및 검체3)의 특성에 따라 희석만으로는 분산이 어려우므로 분산제를 사용하여 검체를 전처리한다.



검체1      검체2      검체3

검체1: 마사지 크림  
검체2: 크림(자외선 차단성분 함유)  
검체3: 크림 파운데이션

**< 기초화장용-크림(자외선차단 성분 함유) >**



검체 1mL + 1mL 폴리소르베이트 80 ▶ 10배 희석 분산 ▶ 검액

Capillary piston 팁을 이용하여 검체 1 mL(g)를 취한 후 적당한 분산제(예: 폴리소르베이트 80) 1mL를 넣어 균질화 시킨다. 충분히 균질화 시킨 후 변형레틴액체배지 또는 검증된 배지나 희석액 8 mL를 넣어 분산시켜 10배 희석액을 만들어 검액으로 한다.

**< 색조화장용-크림 파운데이션 >**



검체 1mL + 1mL Tween 80 ▶ 10배 희석 분산 ▶ 검액

Capillary piston 팁을 이용하여 검체 1 mL(g)를 취한 후 적당한 분산제(예: 폴리소르베이트 80) 1mL를 넣어 균질화 시킨다. 충분히 균질화 시킨 후 변형레틴액 체배지 또는 검증된 배지나 희석액 8 mL를 넣어 분산시켜 10배 희석액을 만들어 검액으로 한다.

### 3. 오일제



#### 참고1

오일제는 희석만으로 검체 전처리가 어려우며, 적당한 분산제를 사용하여 검체를 전처리한다.

#### <색조화장용-립글로즈>



검체 1mL  
+1mL 폴리소르베이트 80



10배 희석  
분산



검액

검체 1 mL(g)를 취한 후 적당한 분산제(예: 폴리소르베이트 80) 1mL를 넣어 균질화 시킨다. 충분히 균질화 시킨 후 변형레틴액체배지 또는 검증된 배지나 희석액 8 mL를 넣어 분산시켜 10배 희석액을 만들어 검액으로 한다.

#### <눈화장장용-아이메이크업 리무버>



검체 1mL  
+1mL 폴리소르베이트 80



10배 희석  
분산

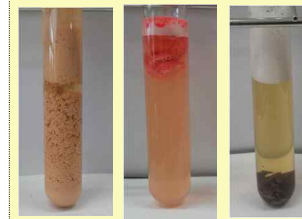


검액

아이메이크업 리무버는 검체 특성상 오일층과 물층으로 분리되어 있는 경우가 있어, 검체를 충분히 흔들어 오일층과 물층을 현탁시킨 후 검체 1 mL를 취하고 적당한 분산제(예: 폴리소르베이트 80) 1 mL를 넣어 균질화 시킨다. 충분히 균질화 시킨 후 변형레틴액체배지 또는 검증된 배지나 희석액 8 mL를 넣어 분산시켜 10배 희석액을 만들어 검액으로 한다.

### 4. 파우더 및 고형제

검체 1 g에 적당한 분산제를 1 mL를 넣고 충분히 균질화 시킨 후 변형레틴액 체배지 또는 검증된 배지 및 희석액 8 mL를 넣어 10배 희석액을 만들고 희석이 더 필요할 때에는 같은 희석액으로 조제한다. 분산제만으로 균질화가 되지 않을 경우 40℃에서 30분 동안 가온한 후 멸균한 유리구슬(5mm: 5~7개, 3mm: 10~15)을 넣어 균질화 시킨다.



#### 참고1

파우더 및 고형제는 희석만으로 검체 전처리가 어려우며, 적당한 분산제를 사용하여야 한다.



#### 참고2

고형제는 최대한 분쇄하여 검체를 취하고, 분쇄가 어려운 검체는 40℃에서 30분 동안 가온한 후 멸균한 유리구슬을 넣고 균질화시킨다. 정확한 온도와 시간으로 가온하여 검체 중 균의 증식에 영향이 없도록 한다.

#### <색조화장용 제품류-페이스 파우더>



검체 1g  
+1mL 폴리소르베이트 80



10배 희석  
분산



검액

검체 1 g에 적당한 분산제(예: 폴리소르베이트 80)를 1 mL를 넣고 충분히 균질화시킨 후 변형레틴액체배지 또는 검증된 배지 및 희석액 8 mL를 넣어 10배 희석액을 만들어 검액으로 한다.

< 색조화장용 제품류-아이브로 펜슬 >



아이브로 펜슬 1g을 멸균된 적절한 도구를 이용하여 가능한 잘게 분쇄한 후, 적당한 분산제(예: 폴리소르베이트 80) 1 mL에 넣고 충분히 분산시킨다. 변형레틴액체배지 또는 검증된 배지 및 희석액 8 mL을 넣은 10배 희석액을 40℃에서 30분간 가온한 후 유리구슬을 넣고 균질화 시킨다.

출용 배지도 사용할 수 있고, 세균의 혼입이 없다고 예상된 때나 세균의 혼입이 있어도 눈으로 판별이 가능하면 항생물질을 첨가하지 않을 수 있다.

① 변형레틴액체배지(Modified letheen broth)

- 육제펩톤 20.0 g
- 카제인의 판크레아틴 소화물 5.0 g
- 효모엑스 2.0 g
- 육엑스 5.0 g
- 염화나트륨 5.0 g
- 폴리소르베이트 80 5.0 g
- 레시틴 0.7 g
- 아황산수소나트륨 0.1 g
- 정제수 1000 mL

이상을 달아 정제수에 녹여 1L로 하고 멸균후의 pH가 7.2±0.2가 되도록 조정하고 121℃에서 15분간 고압멸균한다.

② 변형레틴한천배지(Modified letheen agar)

- 프로테오즈 펩톤 10.0 g
- 카제인의 판크레아틴 소화물 10.0 g
- 효모엑스 2.0 g
- 육엑스 3.0 g
- 염화나트륨 5.0 g
- 포도당 1.0 g
- 폴리소르베이트 80 7.0 g
- 레시틴 1.0 g
- 아황산수소나트륨 0.1 g
- 한천 20.0 g
- 정제수 1000 mL

이상을 달아 정제수에 녹여 1L로 하고 멸균후의 pH가 7.2±0.2가 되도록 조정하고 121℃에서 15분간 고압멸균한다.

③ 대두카제인소화한천배지(Tryptic soy agar)

- 카제인제 펩톤 15.0g
- 대두제 펩톤 5.0g
- 염화나트륨 5.0g
- 한천 15.0g
- 정제수 1000mL

3. 총 호기성 생균수 시험법

1) 검액 조제 : 변형레틴액체배지(Modified letheen broth) 또는 변형레틴액체배지 또는 총 호기성 생균수 시험법의 배지의 적합성시험과 미생물 발육저지물질의 확인 시험을 통하여 검증된 배지나 희석액을 사용하여 「2. 검체의 전처리방법」에 따라 검액을 조제한다.

2) 배지: 총 호기성 세균수시험은 변형레틴한천배지 또는 대두카제인소화한천배지를 사용하고 진균수시험은 항생물질 첨가 포테이토 텍스트로즈 한천배지 또는 항생물질 첨가 사브로포도당한천배지를 사용한다. 위의 배지 이외에 배지의 적합성 및 시험결과의 타당성 시험을 통하여 검증된 다른 미생물 검

이상을 달아 정제수에 녹여 1L로 하고 멸균후의 pH가 7.2±0.2가 되도록 조정하고 121℃에서 15분간 고압멸균한다.

④ 항생물질첨가 포테이토덱스트로즈한천배지(Potato dextrose agar)

감자침출물 200.0 g  
포도당 20.0 g  
한천 15.0 g  
정제수 1000 mL

이상을 달아 정제수에 녹여 1L로 하고 121℃에서 15분간 고압멸균한다. 사용하기 전에 1L당 40mg의 엽산테트라사이클린을 멸균배지에 첨가하고 10% 주석산용액을 넣어 pH가 3.5±0.1이 되도록 조정한다.

⑤ 항생물질첨가사부로포도당한천배지 (Sabouraud dextrose agar)

육제 또는 카제인제 펩톤 10.0g  
포도당 20.0g  
한천 15.0g  
정제수 1000mL

이상을 달아 정제수에 녹여 1L로 하고 121℃에서 15분간 고압멸균한 다음의 pH가 5.6±0.2이 되도록 조정한다. 쓸 때 배지 1L당 벤질페니실린칼륨 0.10g과 테트라사이클린 0.10g을 멸균용액으로서 넣거나 배지 1L당 클로람페니콜 50mg을 넣는다.

3) 조작

가) 세균수 시험: 직경 9~10 cm 페트리 접시내에 미리 균한 변형레틴한천배지 표면에 전처리 검액 1 mL를 도말한다. 또는 검액 1 mL를 같은 크기의 페트리접시에 넣고 그 위에 멸균 후 45℃로 식힌 15 mL의 배지를 넣어 잘 혼합한다. 검체당 최소 2개의 평판을 준비하고 30~35℃에서 적어도 48시간 배양하는데 이때 최대 균집락수를 갖는 평판을 사용하되 평판당 300개 이하의 균집락을 최대치로 하여 총 세균수를 측정한다.

나) 진균수 시험 : 가) 세균수 시험에 따라 시험을 실시하되 배지는 진균수 시험용 배지를 사용하여 배양온도 20~25℃에서 적어도 5일간 배양한 후 100개 이하의 균집락이 나타나는 평판을 세어 총 진균수를 측정한다.

<총 호기성생균수 측정>

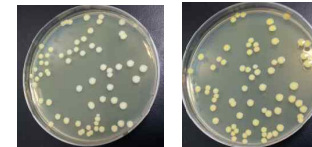
$$\text{세균(진균) 수} = \frac{(x_1+x_2+\dots +x_n)}{n} \times d$$

X : 평판에서 검출된 집락 수  
n : 평판의 개수  
d : 검액의 희석배수

**총 호기성생균수 = 세균수+ 진균수**

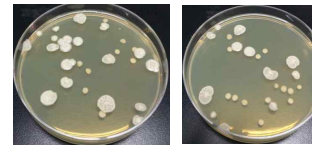
[예시]

세균수 측정



• 세균수(cfu/mL(g)) =  $\frac{(67+70)}{2} \times 10$   
= 685cfu/mL(g)

진균수 측정



• 진균수(cfu/mL(g)) =  $\frac{(31+26)}{2} \times 10$   
= 285cfu/mL(g)

**총 호기성생균수 = 685+285 = 970cfu/mL(g)**

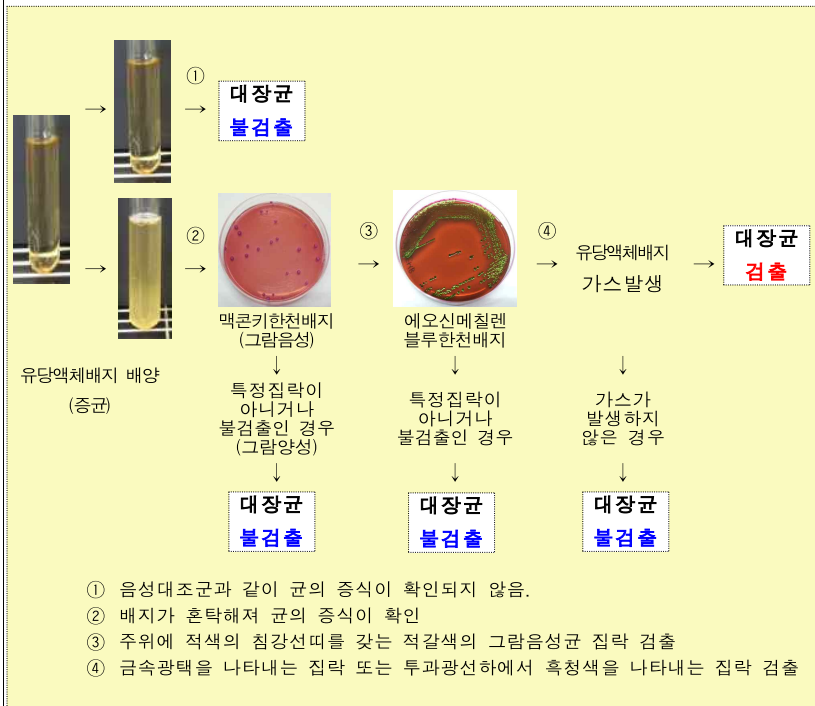
4. 특정미생물 시험법

1) 대장균

검액의 조제 및 조작 검체 1 g 또는 1 mL를 달아 유당액체배지를 사용하여 10 mL로 하여 30~35℃에서 24~72 시간 배양한다. 배양액을 가볍게 흔든 다음 백금이 등으로 취하여 맥콘키한천배지위에 도말하고 30~35℃에서 18~24 시간 배양한다. 주위에 적색의 침강선띠를 갖는 적갈색의 그람음성균의 집락이 검출되지 않으면 대장균 음성으로 판정한다. 위의 특징을 나타내는 집락이 검

출되는 경우에는 에오신메칠렌블루한천배지에서 각각의 집락을 도말하고 30~35℃에서 18~24 시간 배양한다. 에오신메칠렌블루한천배지에서 금속광택을 나타내는 집락 또는 투과광선하에서 흑청색을 나타내는 집락이 발견되면 백금이등으로 취하여 발효시험관이 든 유당액체배지에 넣어 44.3~44.7℃의 항온수조 중에서 22~26 시간 배양한다. 가스발생이 나타나는 경우에는 대장균 양성으로 판정한다.

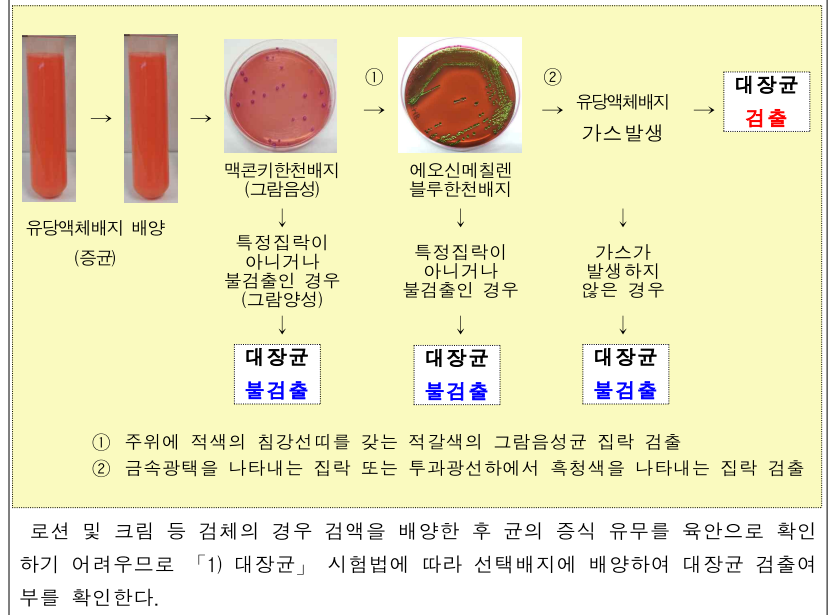
**<육안으로 증식유무 확인이 가능한 경우>**



검체 특성상 투명한 액상의 경우, 검액을 배양한 후 육안으로 확인하여 균의 증식유무를 판정할 수 있다. 검액을 배양한 결과 음성대조군<sup>1)</sup>과 동일하면 대장균 불검출로 판정하고, 균의 증식이 확인이 되면 「1) 대장균」 시험법에 따라 선택배지에 배양하여 대장균 검출여부를 확인한다.

주1) 검체를 넣지 않은 유당액체배지를 동일한 조건하에 배양한 것

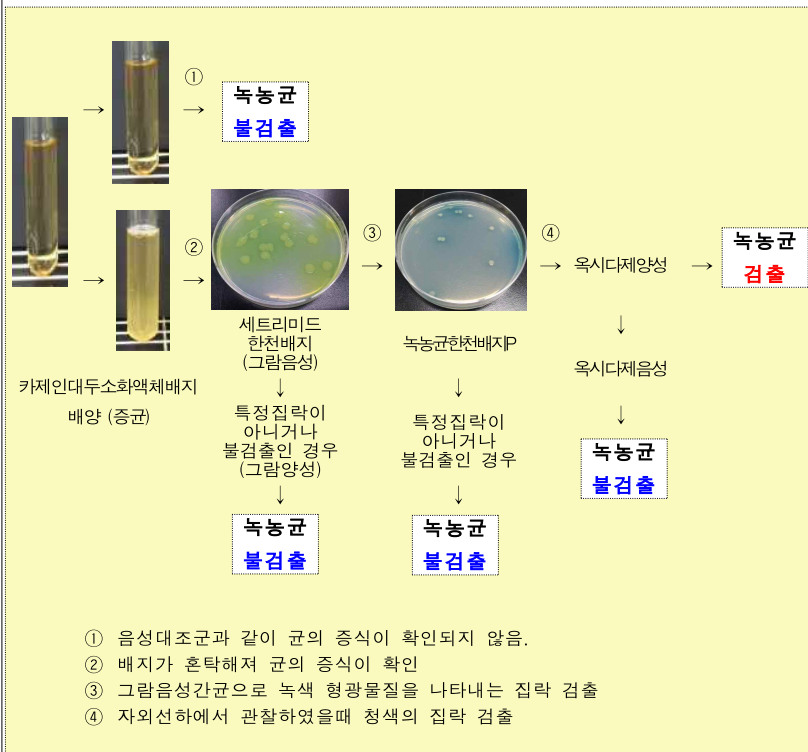
**<육안으로 증식유무 확인이 불가능한 경우>**



**2) 녹농균**

**검액의 조제 및 조작** 검체 1 g 또는 1 mL를 달아 카제인대두소화액체배지를 사용하여 10 mL로 하고 30~35℃에서 24~48시간 증균 배양한다. 증식이 나타나는 경우는 백금이등으로 세트리미드한천배지 또는 엔에이씨한천배지에 도말하여 30~35℃에서 24~48시간배양한다. 미생물의 증식이 관찰되지 않는 경우 녹농균 음성으로 판정한다. 그람음성간균으로 녹색 형광물질을 나타내는 집락을 확인하는 경우에는 증균배양액을 녹농균 한천배지 P 및 F에 도말하여 30~35℃에서 24 ~ 72 시간 배양한다. 그람음성간균으로 플루오레세인 검출용 녹농균 한천배지 F의 집락을 자외선하에서 관찰하여 황색의 집락이 나타나고, 피오시아닌 검출용 녹농균 한천배지 P의 집락을 자외선하에서 관찰하여 청색의 집락이 나타나면 녹농균 양성으로 판정한다. 녹농균의 가능성이 높은 집락은 옥시다제시험을 실시한다. 옥시다제 반응 양성인 경우 녹농균양성으로 판정하고, 옥시다제반응 음성인 경우에는 녹농균 음성으로 판정한다.

<육안으로 증식유무 확인이 가능한 경우>



검체 특성상 투명한 액상의 경우, 검액을 배양한 후 육안으로 확인하여 균의 증식 유무를 판정할 수 있다. 검액을 배양한 결과 음성대조군<sup>1)</sup>과 동일하면 녹농균 불검출로 판정하고, 균의 증식이 확인이 되면 「2) 녹농균」 시험법에 따라 선택배지에 배양하여 녹농균 검출여부를 확인한다.

주1) 검체를 넣지 않은 카제인대두소화액배지를 동일한 조건하에 배양한 것

<육안으로 증식유무 확인이 불가능한 경우>

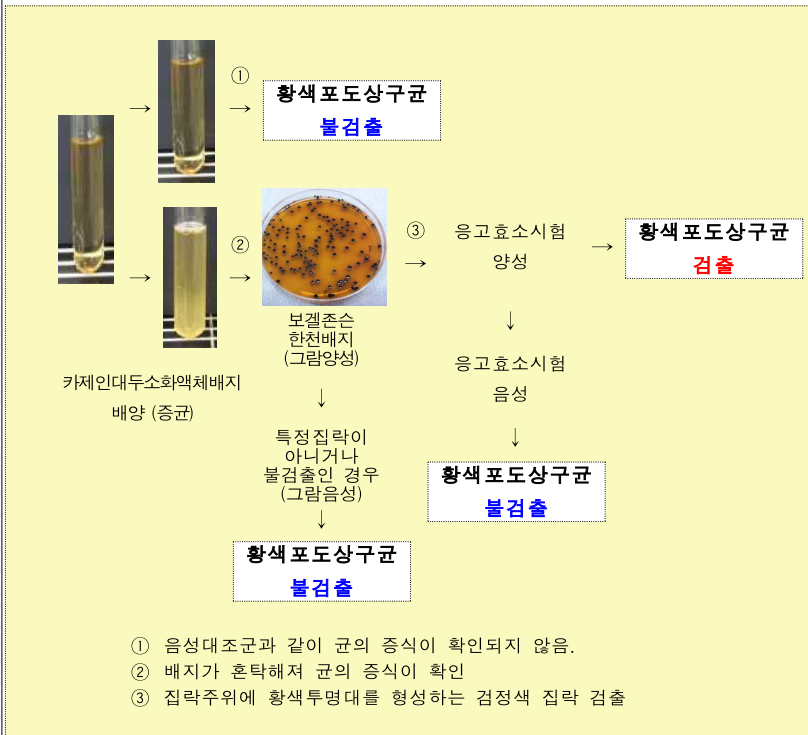


로션 및 크림 등 검체의 경우 검액을 배양한 후 균의 증식 유무를 육안으로 확인하기 어려우므로 「2) 녹농균」 시험법에 따라 선택배지에 배양하여 녹농균 검출여부를 확인한다.

3) 황색포도상구균

**검액의 조제 및 조작** 검체 1 g 또는 1 mL를 달아 카제인대두소화액배지를 사용하여 10 mL로 하고 30~35 °C에서 24~48시간 증균 배양한다. 증균배양액을 보겔존슨한천배지 또는 베어드파카한천배지에 이식하여 30~35 °C에서 24시간 배양하여 균의 집락이 검정색이고 집락주위에 황색투명대가 형성되며 그람염색법에 따라 염색하여 검정한 결과 그람양성균으로 나타나면 응고효소시험을 실시한다. 결과가 양성으로 나타나면 황색포도상구균 양성으로 판정한다.

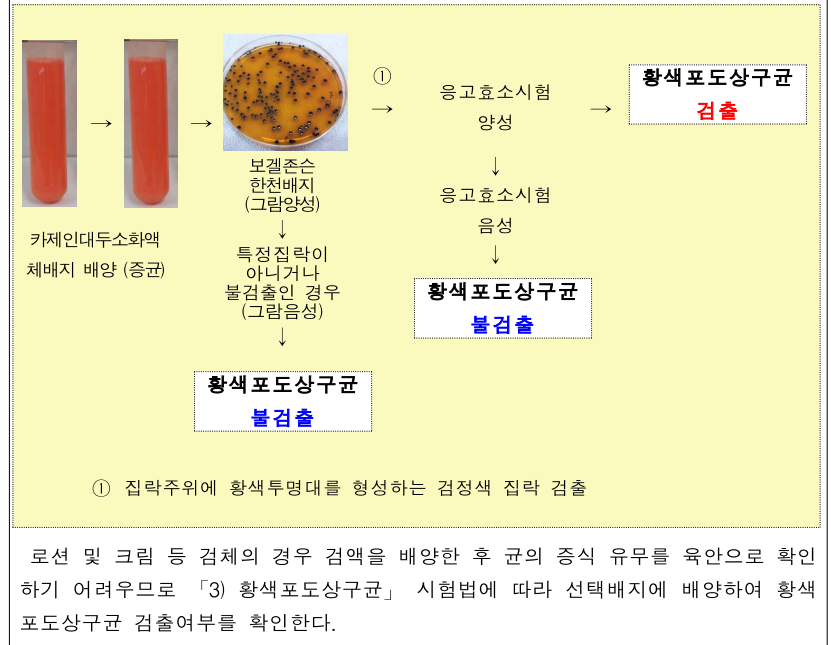
<육안으로 증식유무 확인이 가능한 경우>



검체 특성상 투명한 액상의 경우, 검액을 배양한 후 육안으로 확인하여 균의 증식 유무를 판정할 수 있다. 검액을 배양한 결과 음성대조군<sup>1)</sup>과 동일하면 황색포도상구균 불검출로 판정하고, 균의 증식이 확인이 되면 「3) 황색포도상구균」 시험법에 따라 선택배지에 배양하여 황색포도상구균 검출여부를 확인한다.

주 1) 검체를 넣지 않은 카제인대두소화액배지를 동일한 조건하에 배양한 것

<육안으로 증식유무 확인이 불가능한 경우>



5. 배지의 적합성시험

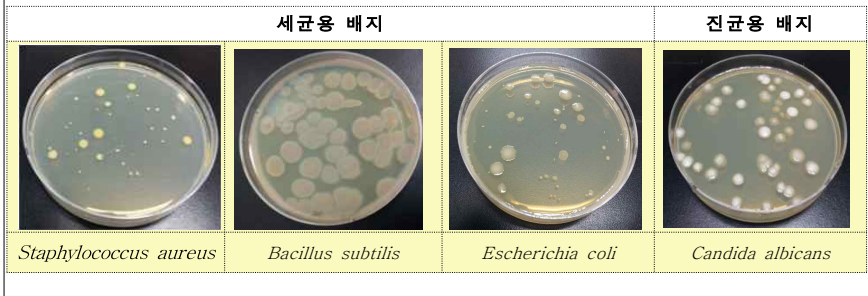
1) 총호기성세균시험용 배지의 적합성시험

표 1.의 준비배양조건에서 배양된 균주 또는 이와 동등하다고 생각되는 균주를 쓸 수 있다. 균액 1 mL당 약 100개의 생균이 함유되도록 완충식염펩톤수 (pH 7.0)에 희석하여 균액을 만든다. 시험에 쓰는 배지는 균액 1 mL를 접종하여 세균은 30~35 °C에서 적어도 48시간, 진균은 20~25 °C에서 적어도 5일간 배양할 때 충분한 증식 또는 접종 균수의 회수가 확인되어야 한다. 또한, 시험에 사용된 배지 및 희석액 또는 시험 조작상의 무균상태를 확인하기 위하여 완충식염펩톤수(pH 7.0)를 대조로 하여 총호기성 생균수시험을 실시할 때 미생물의 성장이 나타나서는 안 된다

표1. 총호기성생균수 배지성능시험용 균주

시험균주	배양
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	호기배양
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	30 ~ 35 °C
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	18~24시간
	호기배양
<i>Candida albicans</i> ATCC 2091 또는 ATCC 10231	20 ~ 25 °C
	48시간

<총호기성생균수용 배지성능 시험결과>



2) 특정미생물시험용 배지의 적합성시험

황색포도상구균 ATCC 6538P 또는 ATCC 6538와 녹농균 ATCC 9027은 카제인대두소화액체배지를, 대장균 ATCC 8739은 유당액체배지를 사용한다. 각 배양액을 완충식염펩톤수에 1 mL당 약 1,000개의 균주가 함유되도록 희석하고 각 균액을 동량으로 섞은 다음 0.4 mL(각 균수가 약 100개)를 황색포도상구균 시험, 녹농균시험, 대장균시험의 접종균으로 한다.

표2. 특정세균시험 배지성능시험용 균주

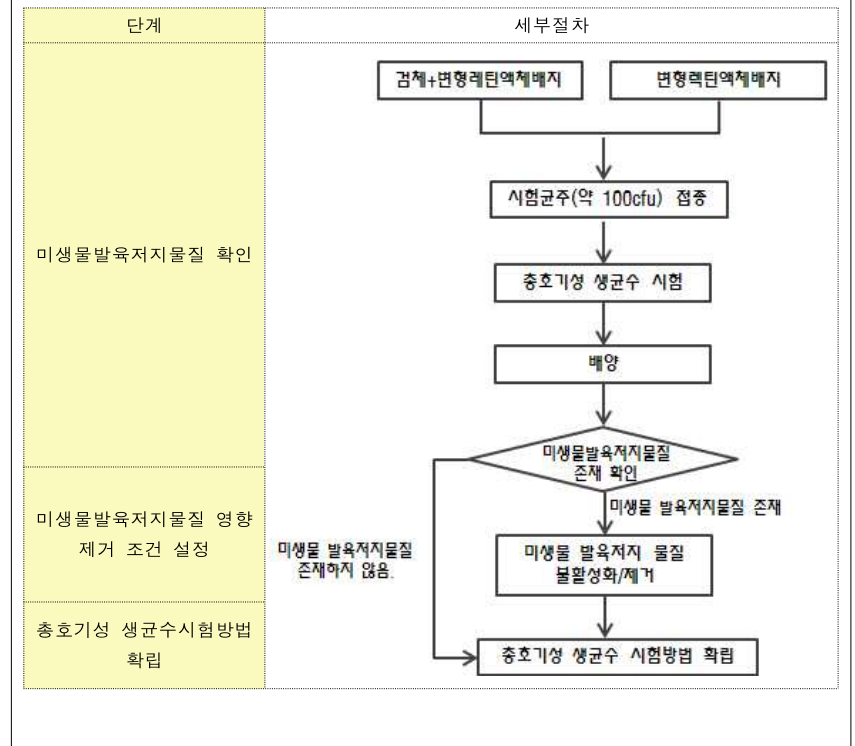
배지	시험균주
카제인대두소화액체배지	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 또는 6538P
유당액체배지	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739

6. 미생물 발육저지물질의 확인시험

1) 총호기성세균시험-미생물 발육저지물질의 확인시험

'6-1) 총호기성세균시험용 배지의 적합성 시험' 항에 따라 시험할 때 검액의 유·무하에서 균수의 차이가 2배 이상 되어서는 안 된다.

<총호기성 생균수시험 대한 미생물발육저지물질 시험 절차>



2) 특정미생물시험-미생물 발육저지물질의 확인시험

'6-2) 특정세균시험용 배지의 적합성 시험' 항에 따라 시험할 때 검액의 유·무 하에서 접종균 각각에 대하여 양성으로 나타나야 한다.

