J. of Korean Oil Chemists' Soc.,
Vol. 22, No. 3. September, 2005. 212~218

티아민 디라우릴 황산염이 함유된 화장품의 항균활성 및 방부효과에 관한 연구

김혁수*·조경환*·이동규†

* (주)정·식품 중앙연구소
† 충북대학교 공업화학과

(2005년 3월 23일 접수 ; 2005년 6월 17일 채택)

A Study on the Antimicrobial Activity and Preservative Effect of Thiamine Dilauryl Sulfate in Cosmetics

Hyuk-Soo Kim*·Kyung-Whan Cho*·Dong-Kyu Lee†

Research Institute of Dr.Chung's Food Co., Cheongju 361-782, Korea
†*Department of Industrial Chemical Engineering, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea*

(Received March 23, 2005 ; Accepted June 17, 2005)

Abstract : Most of cosmetics are emulsion products that contain the source of nutrition vegetable oil, mineral oil, natural extract and carbohydrate etc. There are many possibilities to be contaminated by microbials. We investigated the effect of antimicrobial and minimum inhibitory concentration(MIC) with thiamine dilauryl sulfate(TDS), which was prepared to use cosmetic lotion formulation. Staphylococcus aureus(*S. aureus*) and Escherichia col(*E. coli*) were used as test organism. MIC value of TDS was determined aganist microorganism for the growth inhibition by concentration of TDS. From the MIC results, antimicrobial effect of TDS was generally more effective to gram positive than gram negative. Antimicrobial effect with pH value against some microorganism appeared in the following order : pH 5 > pH 6 > pH 7. It showed strong antimicrobial activities against *S. aureus*, and weak antimicrobial activities against *E. coli*. If it was possible to determine the formulations with TDS, it would be effective to reduce the artificial preservatives.

Keywords : *thiamine dilauryl sulfate*(TDS), *cosmetics*, *antimicrobial activity*, *preservative Effect*.

†주저자 (e-mail : dklee@chungbuk.ac.kr)

1. 서 론

화장품 업계의 글로벌화가 진행되면서 품질 관리의 방법으로 품질 위해요소의 중점관리기준 시스템(Hazard Analysis Critical Control Point : HACCP)과 우수 화장품 제조 및 품질 관리 기준(Cosmetic Goods Manufacturing Practice ; CGMP), 그리고 국제 표준화기구(International Organization for Standardization ; ISO) 등을 도입하는 곳도 적지 않게 많아졌다. 이런 기술적인 능력의 비약적인 발전에도 불구하고 화장품이 미생물에 의한 오염, 변질, 변패 등의 문제점을 항상 가지고 있다[1]. 화장품은 기름이나 물을 주성분으로 구성하여, 그곳에 미생물의 탄소원이 되는 글리세린이나 솔비톨 등과 질소원이 되는 아미노산 유도체, 단백질 등이 배합된 조성물[2,3]이 많아 미생물의 침투가 용이하며 결과적으로 침전물, 혼탁상태, 변패, 변취, 변질, 박막 등을 만든다[4,5]. 곰팡이의 경우는 표면에 균체를 형성하게 되어, 미생물의 대사 생성물[6]에 의한 pH의 변화와 오염 미생물 자체가 분비하는 색소에 의하여 변색이 일어나기도 한다[7,8]. 내용물의 이상현상과 물성의 변화가 발생하는데 주요한 일차적, 이차적 미생물 오염을 방지하기 위해 방부제가 첨가된다[9,10].

방부제의 배합은 용량에 따라 제품의 사용기간과 시기, 용기 형태에 의한 오염의 빈도 등을 고려하여 요구되어지는 최소량을 첨가해야 한다[11]. 방부제 선정시에도 내용물의 물성과 제조공정을 고려하여 선정하는 것이 가장 중요하다[12]. 이상적인 방부제라 함은 폭 넓은 항균효과, 열, 온도 및 pH에 따른 안정성, 다른 처방 성분들과의 상용성, 그리고 제품의 물리적인 성질로 색, 향, 점도에 영향이 없어야 하며, 특히 가장 중요한 것은 값이 싸고 쉽게 이용할 수 있으며, 사용자에게 저자극이며, 환경적으로 문제가 없어야 한다[13,14].

본 연구에서는 현재 사용되고 있는 자극적인 합성 방부제보다 피부에 저자극인 자연 친화적인 성분으로 대용 할 목적으로 실험을 진행하였다. 티아민 디라우릴 황산염(Thiamine Dilauryl Sulfate, TDS)은 식품 첨가물 공전에 등재되어 있는 성분으로 식용이 가능하며 자극이 적은 피부 친화적인 성분이다. TDS의 물성과 성분 특성을 조사하였으며, 항균활성과 방부력 변화에 관한 실험자료를 확보하고, 최종적으로 TDS를 화장품에 배합시 항균 실험을 통하여 방부효과와 적용 가능성을 조사하였다.

2. 실 험

2.1. 사용균주 및 배지

항균력 검색을 위한 실험으로 피검균은 그램 양성 세균인 Staphylococcus aureus(KCTC 1928)을 사용하였고, 그램음성 세균으로는 Escherichia coli(KCTC 1041)을 사용하였다. 항세균 활성 측정을 위한 피검균주인 Staphylococcus aureus(*S. aureus*), Escherichia col(*E. coli*)의 배양배지로는 영양배지(beef extract 0.3%, peptone 0.5%, Difco Lab. Detroit, Michigan, U.S.A.)를 사용하였다. 배지의 pH 범위는 1N HCl과 1N NaOH을 이용하여 pH를 5에서 7까지 조정하여 시편 배지로 사용하였다.

2.2. TDS의 균 감소율 측정

방부제를 함유하지 않은 일반적인 에멀젼 시료에 TDS와 기존에 주로 사용되고 있는 P. P.(Propyl paraben), G115(Imidazolidinyl urea)의 농도가 0.1(w/w)%가 되도록 첨가한 후 피검균 수를 10^6~10^8 CFU/ml이 되게 접종하였다. *S. aureus*, *E. coli* 균주를 35℃에서 정치 배양하였다. 균 배양 에멀젼 처방을 0.85% NaCl로 희석하여 영양 한천 평판배지에 고르게 편 다음 각 균주의 배양온도에서 48 시간 배양 후 균 집락수(CFU)를 세고 시험균의 접종시 균수와 배양한 후의 균수의 변화를 비교하였다. 실험에 사용된 유화 에멀젼 조성은 정제수를 43%, 점증제로 ethyl cellulose 43%를 배합하였다. 보습제 및 미생물의 영양 공급원으로 1,3-butylene glycol 3.5%, propylene glycol 3.5%, soy bean extract 7%를 배합하여 에멀젼 형태의 로션샘플을 제조하였다.

2.3. TDS의 최소 성장억제 농도(MIC)측정

영양 액체 배지에 TDS, P. P., G115를 첨가하여 최종농도가 0.02에서 0.10(w/w)%까지 0.02%씩 증가되도록 첨가하며 시료용액을 만든다. 또한 피검균 수를 10^6~10^8 CFU/ml이 되게 접종하여 *S. aureus*, *E. coli*를 35℃에서 150 rpm

의 속도로 진탕 배양하였다. 24 시간 후 각 농도의 보존제가 함유된 배양액의 광학 밀도를 측정하여 균의 생육이 증가하지 않는 보존제의 농도를 MIC값으로 하였다.

2.4. 전자 현미경에 의한 세균 형태 관찰

LB 고체배지에 12 시간 배양한 균액을 균일하게 도말한 후, 무균적으로 구멍을 만들어 0.02(w/w)%의 TDS용액을 0.01 mL를 채운 후 35℃에서 24 시간 동안 배양하였다. TDS로 인하여 균의 억제현상을 보인 한천 부위를 0.5~1 mm^3의 부피 크기로 잘라 2.5% glutaraldehyde (100 mM 인산 완충액, pH 7.2) 용액에 넣어 3 시간 동안 처리하고, 100 mM 인산완충액 (pH 7.2)으로 15 분씩 3 회 세척한 후, 동일한 완충액으로 만든 1% osmium-tetroxide 용액에서 1 시간 동안 고정하였다. 그 다음에 에탄올 농도를 30%에서 95%까지 변화시키면서 15 분씩 탈수한 뒤, 100% 에탄올로 15 분씩 두 번 탈수하고, isoamyl acetate로 치환하여 자연 건조하였다. 얻어진 생성물을 주사 전자 현미경(SEM, Hitachi S-4500S)으로 *S. aureus* 균주의 형태 변화를 관찰하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. TDS의 물리화학적 특성

TDS는 비타민 B_1 염산염에 고급 알콜 황산에스테르염을 작용케 하고 결정화시켜서 제조한 성분이다. 흡습성이 적고 안전성이 우수하여 식품산업에서 현재 영양 강화제 및 보존 향상제로서 확대되어 사용되어지고 있다. Fig. 1에 TDS의 구조를 표시하였으며, Table 1에는 TDS가 각종 용매에 대한 용해도를 나타내었다. 식품과 화장품 산업에서 용해도가 낮은 성분을 사용시 관능과 유화 안정성에 큰 영향을 주어 산업에 응용시 용해도를 살펴보아야 한다. TDS는 에탄올이나 초산 등의 유기 용매에 잘 녹으며 50%의 에탄올에는 58.0%의 용해도를, 25%의 초산에는 46.9%까지 용해한다. 에탄올 등의 용매를 병용할 경우 항균활성의 상승작용을 기대할 수 있다.

Table 1. Solubility of TDS in Solvents

Solvent		Solubility(%)
Water(25℃)	-	0.021
Ethanol	30%	1.75
	50%	58.0
	70%	60.6
	100%	64.0
Acetic acid	10%	0.05
	25%	46.9
	100%	36.9
Propylene glycol	10%	0.018
	25%	0.026
	50%	0.144
	100%	0.502

3.2. pH에 의한 *S. aureus* 균 감소 영향

pH에 따른 TDS의 항균활성을 알아보기 위해 화장품에서 많이 적용되고 있는 P. P., G115와 함께 균 감소 실험을 하였다. pH에 따른 *S. aureus*에서 TDS의 항균활성 변화는 Fig. 2에 나타내었다. Fig. 2에서 볼 수 있듯이, pH 5에서 7까지 공통적으로 나타나는 결과는 P. P., G115와 TDS 모두 접종 후 4 시간까지 급격한 균의 감소율을 나타내고 있다는 것이다. 특히 pH 5에서는 균 사멸시점이 TDS가 접종 후 18 시간, P. P., G115는 접종 후 22 시간 후로 나타났다. pH 6에서는 TDS, P. P., G115 모두 접종 후 22 시간 후이며, pH 7에서는 TDS와 P. P.가

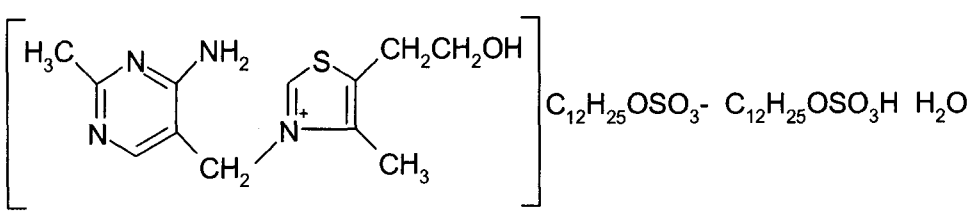
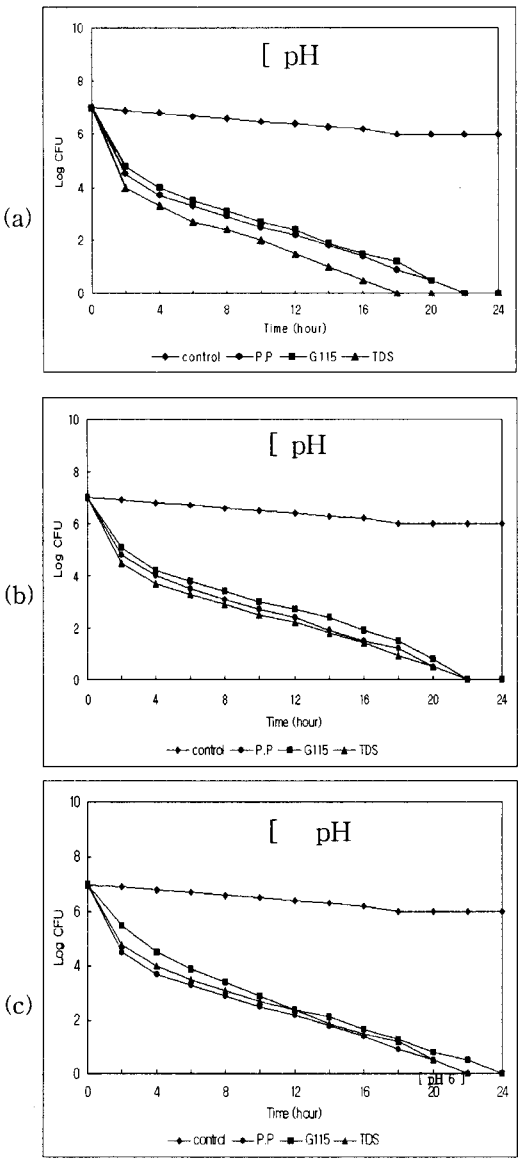


Fig. 1. Structure of TDS.



(a) pH 5, (b) pH 6, (c) pH 7

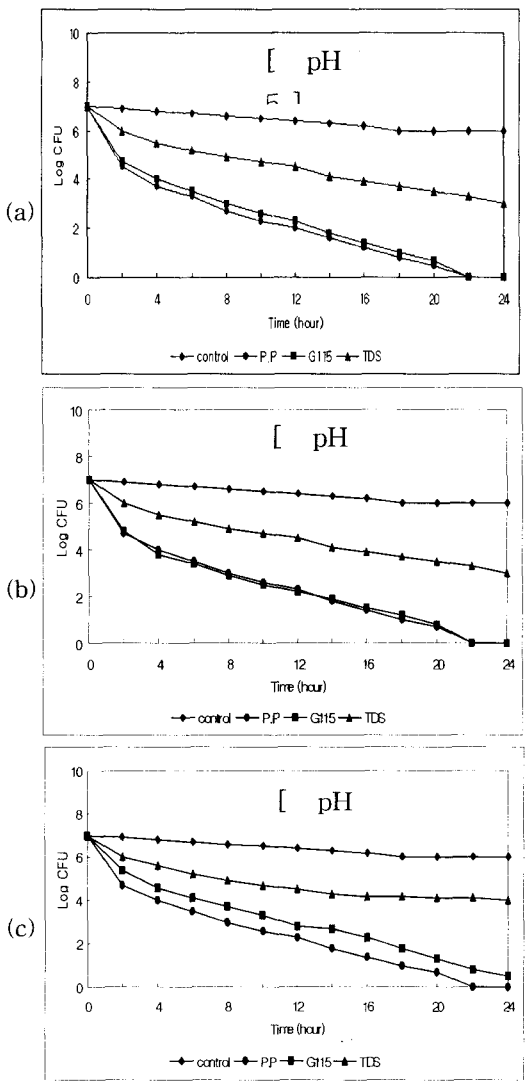
Fig. 2. Survival curves of *S. aureus* in emulsion product according to pH change.

접종 후 22 시간, G115가 접종 후 24 시간 후 균이 사멸하였다. 또한, pH 5에서의 항균효과는 TDS 뿐만 아니라, 대조군인 P. P.와 G115도 균의 생육이 크게 억제됨을 보여주었다. 특히 TDS는 P. P.와 G115보다 우수한 항균효과를 나타내고 있다. pH 6에서 결과는 TDS, P.P., G115 순으로 항균효과를 나타내고 있으나, 균 사멸시간은 접종 후 22 시간으로 동일하였다. pH 7에서의 항균력은 접종 후 12 시간까지 P. P., TDS, G115의 순으로 우수하였으며, 균 사멸 시점은 P. P., TDS가 접종 후 22 시간, G115는 접종 후 24 시간 후로 나타났다. 결과적으로 대조군인 P. P.의 경우 pH 5에서 7까지 거의 유한 균 억제율을 보여주었지만, G115의 경우 pH 7에서 균 억제율이 감소되는 것을 볼 수 있다. 상대적으로 TDS의 경우에는 pH가 증가할수록 균 억제율이 크게 감소되는 것을 볼 수 있다. 그러나 pH 6 이하에서는 TDS가 대조군인 P. P.나 G115 보다도 균 억제율이 조금 더 큰 항균활성을 보여주었다. 반면에 pH 7에서는 P. P. 와는 유사하며, G115보다는 약간의 우수한 항균활성을 나타냈다.

3.3. pH에 의한 *E. coli* 균 감소 영향

그램음성인 *E. coli* 균주에 대한 TDS, P. P., G115의 최종농도를 0.10(w/w)% 되도록 에멀젼 처방에 첨가한 후 pH를 5에서 7까지 조정하며 균 감소율을 측정하였다. *E. coli*가 pH에 따른 TDS의 항균활성의 변화를 Fig. 3에 나타내었다. TDS와 P. P., G115 항균효과 측면에서의 유사한 결과는 접종 후 4 시간까지 급격한 균의 감소율을 나타내고 있다. 그리고 TDS의 항균활성이 대조군인 P. P.와 G115에 비하여 아주 작다는 것이다. pH 5와 6에서는 균 사멸시점이 P. P.와 G115는 접종 후 22 시간인 반면 pH 7에서는 P. P.는 접종 후 22 시간, G115는 접종 후 24 시간 후로 pH 7에서 항균활성이 작아지는 결과를 나타내고 있다. pH별 항균력의 차이를 살펴보면 pH 5와 6에서 항균효과는 P. P.와 G115의 경우 균의 생육이 크게 억제됨을 보여주었다. 하지만 TDS의 경우 상대적으로 낮은 균 억제율을 보여주었다. 이때 기존에 사용되는 P. P.와 G115는 거의 유사한 항균효과를 나타내고 있다. 그러나 pH 7에서의 항균활성은 P. P., G115, TDS의 순으로 우수하게 나타났다. 대조군인 P. P.의 경우 *E. coli*에 대해서도 pH 5에서 7까지 거의 유사한 균 억제율을 보여주었다. G115의 경우에는 pH 7에서 균 억제율이 감소되는 것을 볼 수 있다. 상대적으로 TDS의 경우에는 *E. coli*의 경우 pH 5에서 7까지 모두 균

억제율이 낮은 항균활성을 나타내었으며, 특히 pH 7에서 급격하게 균 억제율이 감소하는 경향을 보여주고 있다.

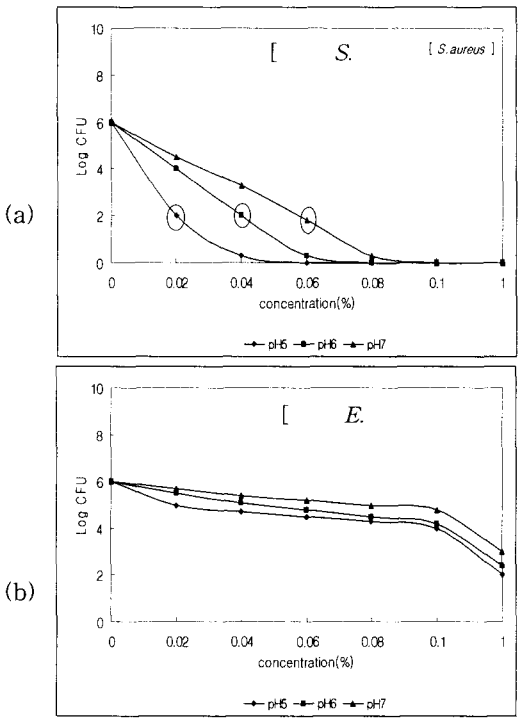


(a) pH 5, (b) pH 6, (c) pH 7

Fig. 3. Survival curves of *E. coli* in emulsion product according to pH change.

3.4. TDS의 최소 성장억제 농도(MIC) 결정

S. aureus, *E. coli*에 TDS의 최종 농도가 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10, 1.00%가 되게 하였다. pH는 5에서 7까지 조정하여 각각의 영양



(a) *S. aureus*, (b) *E. coli*

Fig. 4. Growth inhibition curves of various microorganism according to concentration change of TDS.

Table 2. Minium Inhibitory Concentration of TDS of Various Microorganism

pH	MIC(%)	
	S. aureus	*E. coli*
5	0.02	> 1
6	0.04	> 1
7	0.06	> 1

액체배지에 접종하여 MIC를 측정하였다. Fig. 4에는 TDS의 농도에 따라 pH를 5에서 7까지 범위에서 균주 3종에 대한 항균활성을 나타낸 것으로 이 실험값을 기준으로 MIC값을 설정하였다. TDS의 경우 pH의 증가에 따라 MIC 측정값이 커져 pH가 중성보다는 산성에서 항균활성이 우수한 것으로 나타났다. 또한 균종에 따라

다소 차이는 있으나 그램 음성세균 보다는 그램 양성세균에 더 강한 항균작용이 확인 되었다. 그램 양성균인 *S. aureus*에 대한 TDS의 MIC 농도는 pH 5에서 0.02%, pH 6에서 0.04%, pH 7에서 0.06%를 나타내었다. 그 결과를 Table 2에 TDS에 대한 MIC 값을 나타내었다.

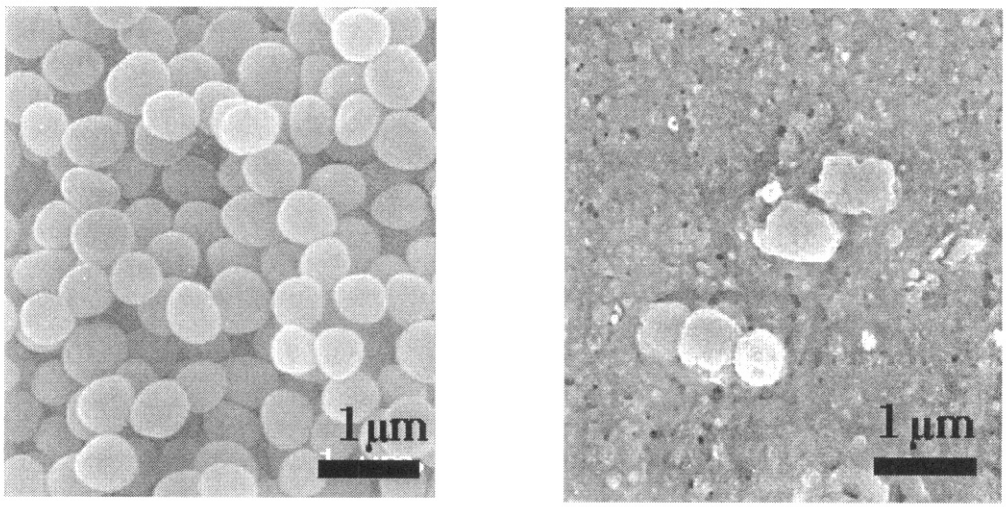
3.5. 전자 현미경에 의한 세균 형태 분석

TDS에 의해 항균작용이 우수하게 나타난 *S. aureus* 균주에 대해 주사 전자 현미경으로 관찰하였다. Fig. 5는 TDS를 *S. aureus* 균주에 처리 전후의 세포 형태를 주사 전자 현미경으로 관찰한 것이다. 그림에서 나타난 것처럼 세포막 구성물질인 peptidoglycan층이 심하게 부풀어 있어 정형성이 많이 소실된 것을 볼 수 있다. 이러한 *S. aureus* 균주의 형태 변화는 TDS에 의하여 야기된 것으로 세포막으로의 흡착과 원형질내로의 침투로 효소 활성 등을 방해함으로서 세균의 증식을 억제하고 괴사시킨 결과라고 사료된다. 항균 메카니즘의 여러 가지 학설중 미생물이 항균제와 접촉하여 세포막중의 인지질이 반응을 함에 따라 접촉면의 세포막 조직이 약해져 파괴되며 항균성분이 세포막을 통과해서 세포내의 영양물의 섭취나 노폐물의 배출 기능을 마비 또는 파괴시켜 핵산이나 단백질의 재생산 능력을 파괴하여 사멸시킨다는 학설[15]이 있으며, 이는 주사 전자 현미경으로 관찰한 본 실험의 결과와 일치한다고 할 수 있다.

4. 결 론

비타민 B_1 유도체인 티아민 디라우릴 황산염에 대해 pH범위를 5에서 7까지 조정한 에멀젼 화장품에서 합성 방부제를 대용함으로서 *S. aureus, E. coli* 균주에서의 생육 억제율을 확인하고, MIC를 측정하여 TDS의 항균활성에 대하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. pH에 따른 항균활성의 변화는 pH의 증가에 따라 항균활성이 떨어져 중성보다는 산성에서 강한 항균활성을 보여 주었다.
2. 균종에 따라 다소 차이는 있으나 그램음성세균 보다는 그램양성세균에 더 강한 항균작용이 확인되었다.
3. 에멀젼 화장품에 TDS 0.1% 농도로 함께 처방하여 생육 억제율을 확인한 결과, *S. aureus*는 pH 5에서 균 사멸시점이 TDS 접종후 18 시간, pH 6과 7에서는 접종 후 22 시간 후 균이 사멸하였다. *S. aureus*는 강한



(a) normal cells (b) cells of grown

Fig. 5. SEM images of *S. aureus* in LB agar containing TDS.

균 억제율을 보여준 반면 *E. coli*는 균 억제율이 낮게 나타났다. 그램양성균인 *S. aureus*에 대한 최소성장억제 농도는 pH 5에서 0.02%, pH 6에서 0.04%, pH 7에서 0.06%를 나타냈다.

참고문헌

1. M. Flores, M. Morillo, and M. L. Crespo, Deterioration of Raw Materials and Cosmetic Products by Preservative Resistant Microorganisms, *International Biodeterioration & Biodegradation,* **40**, 157 (1997).
2. T. Benavides, V. Martínez, M. Mitjans, M. R. Infante, C. Moran, P. Clapés, R. Clothier, and M. P. Vinardell, Assessment of the Potential Irritation and Photoirritation of Novel Amino Acid-based Surfactants by in vitro Methods as Alternative to the Animal Tests, *Toxicology,* **201**, 87 (2004).
3. J. K. Pal, D. Godbole, and K. Sharma, Staining of Proteins on SDS Polyacrylamide Gels and on Nitrocellulose Membranes by Alta, a Colour Used as a Cosmetic, *J. Biochem. and Biophy. Methods,* **61**, 339 (2004).
4. J. P. Bryan, M. H. Sjogren, P. Macarthy, E. Cox, L. J. Legters, and P. L. Perine, Persistence of Antibody to Hepatitis B Surface Antigen after Low-dose, *Vaccine,* **10**, 33 (1992).
5. M. Rosenberg, M. Barki, and S. Portnoy, A Simple Method for Estimating Oral Microbial Levels, *J. Microbiological Methods,* **9**, 253 (1989).
6. H. Scherm and A. H. C. van Bruggen, Response Surface Models for Germination and Infection of *Bremia lactucae*, the Fungus Causing Downy Mildew of Lettuce, *Ecological Modelling,* **65**, 281 (1993).
7. M. S. Nielsen, J. C. Frisvad, and P. V. Nielsen, Protection by Fungal Starters against Growth and Secondary Metabolite Production of Fungal Spoilers of Cheese, *International Journal of Food Microbiology,* **42**, 91 (1998).
8. M. González-Avila, M. Arriaga-Alba, M. de la Garza, M. del Carmen Hernández Pretelín, M. A. Domínguez-Ortíz, S. Fattel-Fazenda, and S. Villa-Treviño, Antigenotoxic, Antimutagenic and ROS Scavenging Activities of a *Rhoeo discolor* Ethanolic Crude Extract, *Toxicology in Vitro,* **17**, 77 (2003).
9. D. S. Orth, Establishing Cosmetic Preservative Efficiacy by Use of D-values, *J. Soc. Cosmetic Chemists,* **31**, 165 (1980).
10. M. Frauen, H. Steinhart, C. Rapp, and U. Hintze, Rapid Quantification of Iodopropynyl Butylcarbamate as the Preservative in Cosmetic Formulations Using High-Performance Liquid Chromatography - Electrospray Mass Spectrometry, *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* **25**, 965 (2001).
11. L. Gershenfeld, Antimicrobial Agents in Cosmetic Preparations, *Cosmet. Perfum.*, **78**, 55 (1963).
12. A. B. Prevot, E. Pramauro, M. Gallarate, M. E. Carlotti, and G. Orio, Determination of Micelle/Water Partition Coefficients of Cosmetic Preservatives: Optimisation of the Capillary Electrophoretic Method, *Analytica Chimica Acta,* **412**, 141 (2000).
13. J. J. Zeelie, Antioxidants-Multifunctional Preservatives for Cosmetic & Tolietry, Formulations, *Cosmetic & Toiletry,* **98**, 51 (1983).
14. H. S. Bean, Preservatives for Pharmaceuticals, *J. Soc. Cosmetic Chemists,* **23**, 703 (1972).
15. S. H. Chang and Y. H. Kim, Antimicrobial Additives for Plastics, *Polymer Science & Technology,* **6**, 145 (1995).